

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-543798

(P2002-543798A)

(43) 公表日 平成14年12月24日 (2002. 12. 24)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマート* (参考)

C 1 2 Q 1/48

C 1 2 Q 1/48

Z 2 G 0 4 3

C 1 2 N 9/12

C 1 2 N 9/12

2 G 0 4 5

G 0 1 N 33/50

G 0 1 N 33/50

P 4 B 0 5 0

33/53

33/53

A 4 B 0 6 3

// G 0 1 N 21/64

21/64

F

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-616383(P2000-616383)

(86) (22) 出願日 平成12年5月5日 (2000. 5. 5)

(85) 翻訳文提出日 平成13年11月8日 (2001. 11. 8)

(86) 国際出願番号 P C T / G B 0 0 / 0 1 7 4 0

(87) 国際公開番号 W O 0 0 / 6 8 4 1 8

(87) 国際公開日 平成12年11月16日 (2000. 11. 16)

(31) 優先権主張番号 9 9 1 0 8 1 1 . 0

(32) 優先日 平成11年5月10日 (1999. 5. 10)

(33) 優先権主張国 イギリス (G B)

(71) 出願人 メディカル リサーチ カウンシル

イギリス国 ダブリュ1エヌ 4エイエル

ロンドン, バーク クレセント 20

(72) 発明者 ブルーン マーティン ハーマン クレメンズ

イギリス ロンドン エヌダブリュ7

1エイエイ ミル ヒル ザ リッジウェイ

イ ナショナル インスティテュート フ

ォア メディカル リサーチ (番地なし)

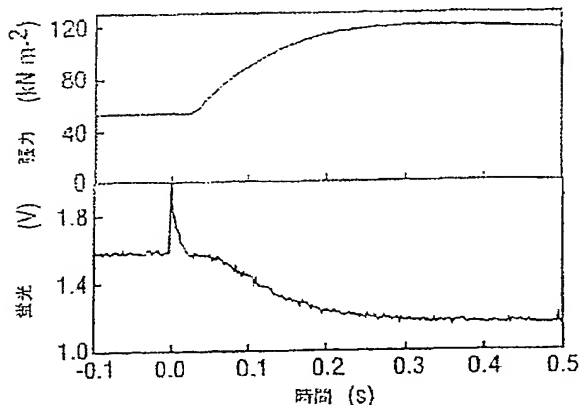
(74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外9名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スクレオシドジホスフェート及びトリホスフェートのためのアッセイ

(57) 【要約】

スクレオシドジホスフェート (NDPs) をスクレオシドジホスフェートキナーゼ (NDPK) のリン酸化酵素の形態の脱リン酸化によって検出し、又は測定し、スクレオシドトリホスフェート (NTPs) をNDPKのそのリン酸化酵素の形態へのリン酸化によって検出し、又は測定する。典型的な方法は、(a) サンプル中にNDPを生成して、NDPKリン酸化酵素と結合する工程、又はサンプル中にNTPを生成して、NDPKをリン酸化する工程及び (b) そのリン酸化形態と非リン酸化形態との間で異なる酵素の特性において変化を検出する工程を含む。これは酵素を標識することによって補助してもよい。定量的データを得ることができる。in vivo及びin vitro測定の両方を行ってもよい。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中のヌクレオシドジホスフェートの存在を検出する方法であって、ヌクレオシドジホスフェートキナーゼ (NDPK) のリン酸化酵素形態の脱リン酸化を検出する工程を含む前記検出方法。

【請求項2】 サンプル中のヌクレオシドトリホスフェートの存在を検出する方法であって、ヌクレオシドジホスフェートキナーゼ (NDPK) のリン酸化酵素形態へのリン酸化を検出する工程を含む前記検出方法。

【請求項3】 リン酸化又は脱リン酸化をNDPKの固有の性質を用いて検出する請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。

【請求項4】 酵素がリン酸化される場合と非リン酸化される場合とで異なる検出可能なシグナルを与える標識を有するようにNDPKを改変する請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。

【請求項5】 NDPKが蛍光性標識を有する請求の範囲第4項記載の方法。

【請求項6】 蛍光性標識がシステイン残基によってNDPKと結合している請求の範囲第5項記載の方法。

【請求項7】 蛍光性標識がIDCC (N-[2-(ヨードアセトアミド)エチル]-7-ジエチルアミノクマリン-3-カルボキサミド) である請求の範囲第5項又は第6項記載の方法。

【請求項8】 ヌクレオシドジホスフェートがADP又はGDPである請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項9】 ヌクレオシドトリホスフェートがATP又はGTPである請求の範囲第2項記載の方法。

【請求項10】 定量的方法である請求の範囲第1項から第9項のいずれか1項記載の方法。

【請求項11】 NDPKが、Asp112→Cys突然変異を有し、この突然変異した残基にIDCC標識を有するMyxococcus xanthusのNDPKである請求の範囲第1項から第10項のいずれか1項記載の方法。

【請求項12】 酵素がリン酸化される場合と非リン酸化される場合とで異なる検出可能なシグナルを与える標識を有するように修飾されたNDPK。

【請求項13】 修飾されたNDPKの標識が蛍光性標識である請求の範囲第12項記載のNDPK。

【請求項14】 蛍光性標識がシステイン残基によってNDPKと結合している請求の範囲第13項記載のNDPK。

【請求項15】 蛍光性標識がIDCCである請求の範囲第13項又は第14項記載のNDPK。

【請求項16】 Asp112→Cys突然変異を有し、この突然変異した残基にIDCC標識を有する *Myxococcus xanthus* のNDPK。

【請求項17】 マクレオシDIGホスフェートの結合に感受性がある少なくとも1つの検出可能な標識の結合によって修飾されるNDPK。

【請求項18】 固定化された請求の範囲第12項から第17項のいずれか1項記載のNDPKを有する基質。

【請求項19】 in vivo又はin vitro診断試薬として使用するための請求の範囲第12項から第17項のいずれか1項記載のNDPK。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本明細書で引用されるすべての文書の内容は、その全体がここに組み込まれるものとする。

発明の分野

本発明は、ヌクレオシドジホスフェート、特にADP及びGDPのためのアッセイ、及びヌクレオシドトリホスフェート、特にATP及びGTPのためのアッセイに関する。

背景技術

ヌクレオシドジホスフェート及びトリホスフェートは、生物学において重要な役割を演じる。ADPは、ATPを形成するための直接の前駆物質であり、細胞エネルギーの一般的な流通物である (the universal currency of cellular energy)。GDPは、スクシニルCoAシンセターゼのための基質であり、クレブスサイクルのキー酵素であり、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼによる糖新生の際に形成される。また、それは、Gタンパク質シグナル伝達、微小管増殖及び視覚励起においても必須である。UDPは、ガラクトースのグルコースへのエピマー化、スクロースの形成及びグリコーゲンの増殖に関係する。CDPは、ホスホグリセリドの合成において重要な基である。また、ヌクレオシドジホスフェートは、トリホスファターゼ及びキナーゼ等の酵素の幾つかの主要なクラスによって触媒される反応の産物であり、従って、運動性、筋収縮、DNA合成、転写、翻訳及び窒素固定を含む多くの細胞プロセスによって産生される。

【0002】

このように、ヌクレオシドジホスフェート及びトリホスフェートの検出及び測定は、生物学及び代謝の研究、特に生体エネルギー論において、重要である。

ルシフェラーゼに基づく生物学的サンプルのADP及びATPのアッセイは、20年以上の間知られている [例えば、参考文献 1、2、3、4]。ADP及びATPの生物発光アッセイは、筋肉及び脂肪組織バイオプシーにおける使用の目的で記載され [5]、ルシフェラーゼを利用する三酵素生物発光システムは、細菌細胞抽出における使用の目的で報告されている [6]。高いATP:ADP比での使用のために最

適化された生物発光ADPアッセイが報告されているが[7]、これはATPの酵素除去を必要とする。一般に、ADPの存在下でATPを測定することはATPの存在下でADPを測定することよりも容易である。

また、酵素分光光度法アッセイも記載されている[例えば8]。

また、生物学的サンプルのGDP及びGTPのアッセイもよく知られている[例えば参考文献9及び10]。

参考文献11は、ADP、GDP、CDP及びUDPのカラムベースクロマトグラフィーアッセイを開示する。

また、GDP及びGTPの放射性アッセイも記載されている[12、13]。in vivo ADPレベルの測定用NMRベースアッセイは、イーストについて知られ[14]、またNMRはADP及びATP及び赤血球を測定するために使用されている[15]。

【0003】

発明の開示

本発明によれば、ヌクレオシドジホスフェートは、ヌクレオシドジホスフェートキナーゼ(NDPK)のリン酸化酵素の形態の脱リン酸化反応によって検出又は測定され、ヌクレオシドトリホスフェートは、そのリン酸化酵素の形態へのNDPKのリン酸化反応によって検出又は測定される。

このように、本発明は、(a)ヌクレオシドジホスフェートキナーゼのリン酸化酵素の形態の脱リン酸化反応を検出する工程を含む、サンプル中のヌクレオシドジホスフェートの存在の検出方法、及び(b)ヌクレオシドジホスフェートキナーゼのリン酸化酵素の形態へのリン酸化反応を検出する工程を含む、サンプル中のヌクレオシドトリホスフェートの存在の検出方法を提供する。

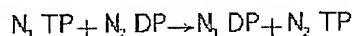
本方法は、典型的には以下の工程を含む。

ー サンプル中のヌクレオシドジホスフェートをNDPKリン酸化酵素と結合させ、又はサンプル中のヌクレオシドトリホスフェートにNDPKをリン酸化させる工程、及び

ー そのリン酸化した、及び脱リン酸化した形態間で異なる酵素の特徴の変化を検出する工程。

【0004】

用語“NDPK”は、EC 2.7.4.6として分類される酵素の活性、すなわちピンポンメカニズムによるヌクレオシドトリホスフェート (N_1TP) の γ -リン酸基のヌクレオシドジホスフェート (N_2DP) への転移を有する酵素を意味する。



この反応スキームに基づいて、NDPKの系統名は、“ATP:ヌクレオシドジホスフェートホスホトランスフェラーゼ”であるが、慣用名は、“ヌクレオシドジホスフェートキナーゼ”である。また、その酵素は、キナーゼ(リン酸化)、ヌクレオシドジホスフェート、ヌクレオシド5'ジホスフェートキナーゼ、ヌクレオシドジホスフェート(UDP)キナーゼ、ヌクレオシドジホスホキナーゼ、ヌクレオチドホスフェートキナーゼ、NM23と多様に記述されている。

【0005】

NDPKは、多くの生物(原核生物及び真核生物の両方)、例えば、ヒト、雌ウシ、サル、マウス、アフリカツメガエル、カラスムギ、エンドウマメ、ジャガイモ、イースト、枯草菌、大腸菌、*Myxococcus xanthus*、トリの骨髄芽球症ウイルス等について記載されている。細胞部位、分子量、オリゴマー構造、等電点、反応速度論、基質優先度(substrate preference)、最適pH、pH範囲、最適温度、カチオン要求性(Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 等)及び種々のアイソフォームによるこれらの相違が記載されている。入手可能な種々の適した酵素を考慮すれば、当業者は、ある特定の状況に適したNDPKを容易に選択でき、精製できる。NDPK酵素は、 γ -ホスフェートをヌクレオシドトリホスフェート(N_1TP)から活性部位ヒスチジンへ移動させるピンポンメカニズムを利用して、リン酸化酵素中間体を形成し、次いでヌクレオシドジホスフェート(N_2DP)を形成する。本発明は、リン酸化酵素中間体とその検出及び測定を与える時間スケールにわたって安定であるとの発見に基づく。リン酸化酵素中間体によって、好ましくはヌクレオチドの二重結合部位によって、ヌクレオシドジホスフェートをリン酸化するその他の酵素も、本発明で使用してもよい。

【0006】

リン酸化酵素は、そのリン酸基をサンプル中の N_2DP に移動して、対応する N_2TP を形成することができる。従って、この移動の検出は、ヌクレオシドジホスフェ

ートの検出に使用することができる。従って、本発明に従ってヌクレオシドジホスフェートを検出するために、リン酸化酵素が試薬として要求される。これは、例えばNDPKを過剰のNTP、典型的にはATPとともにインキュベートすることによって容易に形成することができる。この方法において、リン酸化酵素の形成は、例えばEDTAを用いて Mg^{2+} を除去することによって促進される[16]。また、リン酸化試薬としてホスホラミデート(phosphoramidate)を用いてヒスチジンの化学的リン酸化を利用してもよい[17]。

リン酸化酵素は試薬として使用するために単離することができる。リン酸化酵素は、脱リン酸化しないで48時間よりも長く氷で貯蔵でき、 $-80^{\circ}C$ で長期間（少なくとも5ヶ月）貯蔵できることがわかった（たとえ繰り返された凍結融解が脱リン酸化を生じたとしても）。その調製のために必要な時間範囲よりも長いリン酸化酵素の安定性は、その後にATPアーゼ由来のADPの放出等の動力学的現象をモニターするために、特に有利である。

【0007】

NDPを含むサンプルに加えた場合、リン酸化酵素は、そのリン酸基のNDPへの移動によって脱リン酸化される。NTPを含むサンプルに加えた場合、リン酸化酵素は、NTP γ -リン酸基のその酵素への移動によって形成される。本発明は、NDPKのリン酸化及び脱リン酸化の形態間を識別する能力に頼る。

NDPKのリン酸化及び脱リン酸化の形態を識別するために、任意の好適な測定可能な変化を利用することができる。

例えば、酵素の固有の特性が利用できる。感度の異なるレベルによって選択される特定のNDPKに依存して、以下の方法は、どのようにして脱リン酸化／リン酸化を検出するかを示した例である。

- ホスフェートの位置（すなわち、NDPKとの結合又はNTPの γ -ホスフェートとして）は、 ^{31}P NMRスペクトルによって確認できる。

- その環境が脱リン酸化によって変化するプロトンは、例えばNMRによって検出できる。

- 脱リン酸化は、タンパク質のトリプトファン残基の蛍光の変化を生じる場合がある[例えば、参考文献18]。

－ 脱リン酸化は、放射標識したリン酸化酵素由来の ^{32}P の減少によって検出できる。放射性同位元素は、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いてNDPKに都合よく組み込むことができる。

－ 円偏光二色性又は任意のその他の好適な分光測定方法は、脱リン酸化で起こるコンホメーション変化を検出できる。

－ 脱リン酸化は、結果として表面プラズモン共鳴特性の変化を生じる場合がある。

【0008】

野生型酵素に固有な性質を利用するよりも、とにかく酵素を修飾することが望ましい。また、これは、選ばれたNDPKの脱リン酸化が容易に行われる固有の測定可能な変化を示さない場合重要である。

1つの特に好ましい修飾は、典型的にはシステイン残基による蛍光標識の酵素への付加である。野生型タンパク質に好適なシステイン残基がない場合（例えば、*Myxococcus xanthus*のNDPK）、これは変異原性によって容易に導入できる〔例えば19〕。当業者は、突然変異のための好適な位置を容易に決定でき、その上突然変異が酵素の活性を乱さないことを保証する〔例えば20〕。任意の与えられたアミノ酸残基で、特定の標識はその他よりもよい結果を与える場合がある。標識及び残基の好適な組み合わせは、ルーチン実験によって決定できる。

【0009】

好ましい蛍光性標識は、クマリン含有化合物 (around coumarin) をベースとする。特に好ましくは、 $\text{N-[2-(ヨードアセトアミド)エチル]-7-ジエチルアミノクマリン-3-カルボキサミド}$ であり〔21；図1〕、以降簡単に‘IDCC’と呼ぶ。これは、システイン残基と結合するのが好ましく、NDPKがリン酸化される場合、強い蛍光を、NDPKが脱リン酸化される場合、弱い蛍光を示すのが好ましい。好適にNDPKに結合した場合、この標識は、リン酸化酵素がはるかに高い濃度のATPの存在下で少量のADPを検出できる利点を提供する。これは、例えば単一の筋繊維でATPレベルが高い状況において、実験のために非常に需要である。また、それは、ADPレベルの変化に対して非常に素早く反応することができ、数百マイクロモルの範囲を超える大きなシグナル変化を与える。

同様の方法で導入できるその他の標識としては、ESR標識、発光標識、燐光標識及びその他の好適な発色団が挙げられる。

当業者が入手可能な種々のオブションの幾つかは、リアルタイムに酵素のリン酸化／脱リン酸化を検出するためのその他のものよりも適していることは理解されるであろう。蛍光は、リアルタイム検出にかなり適しているが、放射標識を用いるような方法は、終点を測定するのにより適している。

【0010】

アッセイされるヌクレオシドジホスフェート／トリホスフェートは、利用されるNDPKの基質でなければならない。種々のNDP基質としては、ADP、CDP、GDP、UDP、IDP、XDP、それらのデオキシ誘導体（例えば、dADP、dCDP、dGDP、dTDP、dUDP）、6-アザ-UDP、8-ブロモ-IDP、8-アザ-GDP、及び8-アザ-UDP、及びアデノシン5'-メチレンジホスホネートが記載されている [例えば、22、23、24]。これらの各化合物は、リン酸化酵素によってリン酸化され（利用されるNDPK及び基質に依存して、種々の反応親和性及び反応速度論によって）、このように本発明に従ってアッセイできる。

本発明は、好ましくはADP又はGDPを検出し、測定するために使用される。従って、これらの基質の1つに対して選択性を示すNDPKが選択される。

【0011】

本発明の好ましい実施態様において、この検出方法は定量的データを与え、すなわち本発明は、サンプル中のヌクレオシドジホスフェート又はトリホスフェートの定量化方法を与える。これは、典型的には、NDP又はNTPの濃度に対してNDPKの検出可能な特徴の変化に関係する工程を含む。これは、行われるべき校正（例えばIDDC等の蛍光性標識による脱リン酸化の測定について）又は標準との比較を要求してもよいことは理解されるであろう。校正は、典型的には測定される濃度の所望する範囲で行われる。

第一の定量的局面において、ヌクレオシドジホスフェート又はヌクレオシドトリホスフェートの量は、サンプルへのリン酸化酵素（NDP）又は非リン酸化酵素（NTP）の添加後、リン酸化酵素のレベルにおける減少（NDP）又は増加（NTP）を測定することによって決定される。

第二の定量的局面において、ヌクレオシドジホスフェート又はトリホスフェートの産生速度は、時間に対するリン酸化酵素のレベルにおける減少 (NDP) 又は増加 (NTP) によって決定できる。測定値を好適な数学的モデル (例えば、一次指数関数的減少に基づく単純モデル) とフィッティングすることによって、ヌクレオシドジホスフェート又はトリホスフェートの産生速度を決定することができる。この局面において、リン酸化酵素 (NDP) の脱リン酸化又は酵素 (NTP) のリン酸化は、リアルタイム検出法を用いて測定されるのが好ましい。

【0012】

本発明の方法は、*in vivo*又は*in vitro*の使用に適しているのが好ましい。この方法は、筋繊維のインサイツの使用に適しているのが好ましく、アクトミオシンからのADP放出速度を計算するのに適しているデータを与えるのが好ましい。

リン酸化酵素の脱リン酸化を検出する工程 (NDP関連局面) と同様に、本方法はNDPKリン酸化酵素を興味のあるサンプルに添加する初期工程を通常含んでいる。これは非リン酸化NDPKからリン酸化酵素を調製することに先行してもよい。

また、本方法は、定量的な値を導くためにデータを式に当てはめる等の方法の際に、得られる任意のデータを分析する工程を含んでもよい。

好ましくは、本方法は、NDPK活性を阻害する場合があるデオフィリン、デスダミン (desdanine) 及び Ag^+ 等の試薬の使用を回避する。

【0013】

上述の方法と同様に、本発明は本方法における使用のための試薬を提供する。

本発明は、酵素がリン酸化される場合と非リン酸化される場合とで異なる検出可能なシグナルを与える標識を有するように修飾されるNDPKを提供する。

修飾されたNDPKの標識は蛍光性基であってもよく、好ましくはIDCCである。標識は、典型的には酵素のアミノ酸残基に結合している。標識をシステイン残基に結合することが好ましい。

特に好ましい試薬は、Asp112→Cys突然変異を有し、この突然変異した残基にIDCC標識を有する*M.xanthus*のNDPKである。リン酸化酵素としてのこの試薬は、ATPよりもADPに約3オーダーの大きさでより感受性が高い。

また、本発明は、ヌクレオシドジホスフェートの結合に感受性がある少なくとも

も1つの検出可能な標識の結合によって修飾されるNDPKを提供する。

また、本発明は、そこに固定化されたこれらのNDPK試薬を有する基質を提供する。これらはカラム又はビーズを含む。これは ^{32}P -リン酸化酵素と組み合わせて使用してもよく、固定化されたNDPKと共にインキュベートされるサンプル中のADPはATPへのその変換に放射標識される。従って、遊離溶液 (free solution) 中で放射能は最初のサンプル中のADPの量を示す。

また、本発明はこれらのNDPK試薬の産生方法を提供する。

さらに、本発明は、in vivo又はin vitro診断上の試薬としての使用のために、これらのNDPK試薬を提供する。

【0014】

実施例

一般的な分子生物学的技法はSambrookら [25] に従って行った。

NDPKの調製

M.XanthusのNDPKは、大腸菌においてクローン化され、発現されるndk遺伝子によってコードされる [26]。タンパク質は16kDaサブユニットのホモテトラマーであり、特徴付けられており、結晶構造が決定されている [16、27]。野生型配列は任意のシステインを含んでいないため、遺伝子は、ホスホチオエートベース法 [28、アマシヤムによるキットの形態で産生される] 又はPCRベースクイックチェンジキット [ストリタジーン] を用いて大腸菌株TG1及びDH5 α の部位特異的変異誘発によってシステイン残基を導入するために操作される。

アマシヤムキットを用いて、M.xanthus由来のndk遺伝子を含むpJM5C2Aの0.8kb HindIII-EcoRIフラグメント [29] をM13mp19と結合し、得られた組換えクローンを使用して、変異原性のために一本鎖DNAテンプレートを提供した。クローン化のために、突然変異させたndk遺伝子をpJM5C2Aにもどってクローン化した (cloned back into)。別のものとして、M13ndk構築物の0.7kb BstXI-EcoRI フラグメントをインビトロゲン (商標) pRSetA発現ベクターの修飾された形態に結合し、NDPKのN末端と融合したヒスチジンタグのための配列のそのコード化は除去されていた。これはプラスミドの3.5kb pRSndkX系列を生じ、ここで最後の“X”は一連のndk突然変異の数である。

また、pRSndkはクイッククレンジ法のテンプレートとして使用した。

【0015】

D112C (すなわちAsp-112をCysに突然変異した) 及びD62Cを含むシステイン残基を含む種々のミュータントタンパク質を調製した。突然変異のための位置は、典型的には結晶構造中に見られるヌクレオチド結合間隙の近接部に基づいて選択された[16]。ミュータントD112C遺伝子をプラスミドpRSndk4で産生し、また発現のためにそれを使用した。最もよい結果について、新たにトランスフォームした細胞をスターター培養のために使用した。200 μ lカルシウムコンピテントBL21細胞[Novagen]を2ngのpRSndk4プラスミドDNAにより、30分間氷上でインキュベートした。次いで、この混合物の半分を0.1mg/mlのアンピシリンを含むLB寒天プレートにまき、37℃で一晩インキュベートした。プレートは、典型的には50から100の群体を含んだ。0.1mg/mlのアンピシリンを含む100mlのLB培地にプレートから2から3の群体を接種し、37℃で9時間増殖して、ユニット細胞は定常期に入った。主培養のために、8 \times 500mlのLB+アンピシリンを10mlの開始培養に接種し、37℃で6時間インキュベートし、その時間後細胞は、典型的には0.38のOD₅₅₀に達した。この時点で、0.5mg/mlのIPTGを各フラスコに添加し、細胞を更に16時間増殖した。細胞をベックマンL2遠心機で、3800rpmで、20℃で20分間遠心分離することにより回収した。ペレットを100mlの緩衝液A (20mMのトリス-HCl, pH 8.2, 1mM EDTA) に再懸濁し、-80℃で貯蔵した。

約35mlの凍結した細胞懸濁液をゆっくり解凍し、次いで超音波処理することによって溶解した。その上澄み(すなわち粗製抽出物)を保持した。発現レベルをSDS-PAGEにより決定した。NDPK^{112C}は50%よりも多いサイトゾルタンパク質を産生した。

NDPK精製は2つのカラムクロマトグラフィの工程を含む。最初にpH及び緩衝液A+10mMのDTTを用いたイオン強度の調整した後、粗製抽出物(約200ml)を120mlのQセファロースイオン交換カラムに4℃及び2.0ml/minの流速で入れた。カラムを1体積の緩衝液で洗浄し、1ml/minの流速で0から0.3MのNaClの連続線形勾配(500ml)で溶出した。NDPKのバルク(約80%)はこれらの条件下で樹脂に結合しない。

【0016】

Amicon YM10限外濾過膜を用いた濃縮後、溶出物を緩衝液AのG-100セファローズゲル濾過カラムに入れた。1.0ml/minの流速で、溶出プロファイルは2つのピークを示した。第1はDNAを含み、第2はタンパク質を含んでいた。NDPKを含む画分を貯蔵し、前と同様に濃縮した。

同様の配列を有し、テトラマーでもある大腸菌NDPKによる混入のないことが確認された[30]。質量分析データは、精製したタンパク質がミュータントタンパク質-N末端メチオシンの計算したMWと適合するMW 15993±1Daを有する単一種であることを示し、大腸菌内で発現した場合、それが欠落していることが示された[16]。4リットルの培養からの純粋なNDPK^{0112c}の収量は約300mgであった。

【0017】

NDPKの蛍光性標識

NDPK^{0112c}を50mMのトリス/HCl (pH 8.1) 中で2.5倍過剰量のIDCC (図1) で、1時間37℃でインキュベートした。典型的な実験において、標識溶液の体積は3mlであり、NDPK^{0112c}の濃度は150 μ Mであった。インキュベーション後、この溶液を0.2 μ MのAcrodiscフィルター (Gelman) により濾過し、緩衝液B (10mMのトリス-HCl, pH 8.0, 1mMのEDTA) で平衡にしたPD10脱塩カラム (ファルマシア) に入れた。標識したタンパク質を含む溶出物 (約6ml) をすぐに緩衝液Bで平衡にした25mlのQ-セファロースカラムに入れ、次いで0から0.1Mの20mlのNaClの線形勾配にした。勾配を適用した後標識したタンパク質を完全に溶出し、標識していないタンパク質と同様の方法で濃縮した。タンパク質の濃度は、フルオロフォアの吸光度スペクトルは不変であると仮定して (ϵ_{430nm} 46800M⁻¹cm⁻¹)、吸光度分光法を用いて測定した。この濃度の値は、ウシ血清アルブミン検量線を用いる比色アッセイによって測定されたものと一致する。276nmのIDCCの吸光度 (ジテオスレイトール付加物中に430nmで0.198の吸光度) で補正した後、NDPKのモル吸光係数は ϵ_{276nm} 7600M⁻¹cm⁻¹と計算された。

【0018】

標識及び精製後の収率は典型的には65%であった。この高い収率は、Cys-112

のチオール基が容易に利用できることを示している。質量分析は、1つの分子IDCCがタンパク質分子毎に組み込まれ、二番目の部位の標識を示さないことを明らかにし、質量はIDCC-NDPKで予想されるものであった。

突然変異及び標識化はオリゴマー形成に作用しないことを確認して、複合体のMWを沈降平衡遠心分離によって測定した。結果は、IDCC-NDPKがMW 62.7kDa (質量分析データからテトラマーについて計算されるよりも4%低い) のテトラマーであることを示す。

新しいミュータント／フルオロフォアの組み合わせの蛍光特性の素早い分析が要求される場合、標識化は、典型的には100から200 μ lのNDPK濃度を用いて、阻外濾過及びQ-セファロース工程を避けて、より小さいスケールで行った。

試験したその他のチオール反応性環境感受性蛍光標識は、MDCC (N-[2-(1-マレイミジル)エチル]-7-ジエチルアミノクマリン-3-カルボキサミド) を含んでいた [21]。

【0019】

リン酸化

IDCC-NDPKを典型的には5倍過剰であるが1mM以下のATPと共にインキュベートした。インキュベーションは30から45分間37℃で10mMのトリス/HCl, pH 8.0, 1mMのEDTA又は10mMのPIPES, pH 7.0, 1mMのEDTA中であつた。タンパク質を同じ緩衝液で平衡化したPD10カラムを用いて分離した。典型的には溶出したタンパク質の90%より多くがリン酸化酵素であつた。溶液は、直ぐに又は48時間まで氷上で貯蔵した後使用した。必要な場合、溶液はマイクロ遠心分離濃縮器を用いて濃縮した。

【0020】

蛍光特性

リン酸化酵素 (IDCC-NDPK~P) の分光学的特性を非リン酸化形態の酵素と比較した。データはキセノンランプ及び2.5又は5nmに設定したモノクロメータースリット幅を有するPerkin-Elmer LS50B発光分光器で記録した。IDCC-NDPKの蛍光は50 μ MのADPの存在下よりも50 μ MのATPの存在下で4倍大きかった (図2A)。同様の結果は100 μ MのGDP/GTPで得られた (図2B)。両方の場合に、スペクトルは2

0mMのPIPES, pH 7.2, 2mMの MgCl_2 中に $2\mu\text{M}$ のタンパク質を含む $200\mu\text{l}$ の溶液から 20°C で記録した。励起は441nm、スリット幅5nmで行った。小さな体積変化(1%)のための補正は行わなかった。これらの結果は、IDCC-NDPK~Pが非リン酸化形態と比較して強い蛍光を有することを示す。

【0021】

ADPを有する $2\mu\text{M}$ のIDCC-NDPK~Pの溶液の滴定は蛍光シグナルの大きな減少を示したが(図3A)、ATPでは同じ濃度範囲($<100\mu\text{M}$)で変化はなかった。同様のデータをGDP/GTPで得た(図3B)。ADP/ATPアッセイは10mMのトリス/HCl, pH 8.0, 5mMの MgCl_2 中で、 21°C で行った。励起は432nm(5nmのスリット幅)であり、発光は478nm(2.5nmのスリット幅)で記録した。GDP/GTPアッセイは20mMのPIPES, pH 7.0, 2mMの MgCl_2 中で、 20°C で行った。励起は441nm(5nmのスリット幅)であり、発光は475nm(5nmのスリット幅)で記録した。両方の場合に、データは小さな体積増加のために補正した。図3BにおいてGTPの最初の添加での小さな減少は希釈した $200\mu\text{M}$ の保存液におけるGTPの部分的な加水分解によるものであり、その後のGTP添加は2mMの保存液からであった。

【0022】

非リン酸化酵素のデータと共に(図4A及び4B)、これはほとんどの蛍光変化が酵素のリン酸化/脱リン酸化によるためであるということを示唆する。

$50\mu\text{M}$ を超えるADPの増加は小さな蛍光の増加を生じる。これは、標識化しない野生型酵素について示唆されるように[18]、おそらくADPとNDPKとの非特異的な相互作用によるものである。蛍光シグナルの変化は少なくとも50%のタンパク質濃度まで[ADP]に対して線形である。

蛍光測定から定量的データを導くために、図5に示される校正曲線をプロットした。校正したデータは $10\mu\text{M}$ のIDCC-NDPK~Pと0、2.5、5.0、7.5又は $10.0\mu\text{M}$ のADPを含む $50\mu\text{M}$ のATPとを混合することによってストップフロー実験で得た(10mMのPIPES緩衝剤, pH 7.0, 1mMの MgCl_2 , 20°C)。蛍光変化の大きさ(ΔF)は各濃度で2つの実験を平均し、ADP濃度に対してプロットした。

IDCC-NDPKとIDCC-NDPK~Pとの間のフルオロフォアの吸収最大で6nmのシフトがあるが、発光最大では2nmのみである。標識した酵素の2つの形態について蛍光量

量子収量はエタノール中のクマリン314について既知の値0.83 [31] をリファレンスとして用いて測定した。リン酸化した酵素 (0.22) から非リン酸化の酵素 (0.054) まで行った量子収量は4倍減少し、発光強度の観測された変化によく一致したが (図2)、リン酸化酵素の量子収量は緩衝剤中のクマリン314 (0.52) よりもまだ明らかに低かった。

【0023】

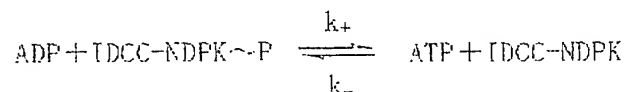
過渡的動力学

3つの異なる過渡的動力学測定はストップフロー装置で行った。

第一に、IDCC-NDPK~Pの脱リン酸化速度をADP濃度の範囲で測定した。図6 Aは20mMのPIPES, pH 7.0, 2mMのMgCl₂中に1 μ Mのタンパク質を有する50 μ MのADP (a) 及び250 μ MのADP (b) の混合についての発光データを示す。観測された速度定数 (a: $11.1 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$; b: $57.2 \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$) は、ADP濃度の増加に比例して線形に増加し、二次速度定数は線形フィットの傾きから計算され、 $0.21 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ を得た (図6 C)。

第二の実験において、リン酸化酵素産生速度はIDCC-NDPK~P酵素とATPとを混合することによって測定した (図6 B)。再度、ATP増加により速度は線形増加し (50 μ MのATPで $5.57 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$; 250 μ MのATPで $18.4 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$)、導出される二次速度定数は $0.072 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった (図6 C)。

第三の実験において、脱リン酸化速度は種々の濃度のATPの存在下で測定した。観測された速度はその非存在下よりもATPの存在下でより大きかったが、強度変化はより小さかった。図6 Cの断続線 (---) の傾きから、二次速度定数はATPの存在下で $0.135 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と計算される。ATPによって生じる速度の増加は酵素の平衡状態を考慮することによって以下のように表される。



観測される速度は $k_+ [\text{ADP}] + k_- [\text{ATP}]$ であり、従って $[\text{ADP}]$ 及び $[\text{ATP}]$ と共に増加する。

この速度促進は、筋繊維において、例えばATPレベルが通常少なくとも1mMである場合、有利である。リン酸化酵素の脱リン酸化は、たとえ初期に低いADP濃度

であっても非常に早い必要がある。

【0024】

単一の筋繊維における測定

実験は Ca^{2+} の存在下で単一のウサギの腰筋繊維で、以下の変更を伴って本質的に参考文献32に記載される通りに行った。バックグラウンドADPを除去するために8U/mlのアビラーゼを含む硬直溶液 (rigor solution) に10分間の繊維のインキュベーションは380 μ MのIDCC-NDPK~P及び5mMのNPEケージ化ATP (ATPの P^3 -1-(2-ニトロフェニル)エチルエステル) を含む添加液における10分間のインキュベーションを伴った。繊維をシリコーンオイルに移し、ATP (約1mM) をゼロ時間でレーザーフラッシュ光分解 (347nm) によって放出した。実験の際の温度は18℃であり、水溶液はpH 7.1及びpCa 4.5であった。蛍光励起は425nmであり、発光はロングパスフィルター (450から650nm) を通して検出した。

時間ゼロの後、蛍光トレース (図7の底の曲線) は3つの部分からなり、第1はフラッシュアーチファクト、次いで最初のATPアーゼサイクルがADPに関して生じる時間の遅れ、最後にIDCC-NDPK~PとADPとの反応を表す蛍光が緩やかに減衰する相。この曲線の初期の傾きは、11s⁻¹のアクトミオシンからのADP放出速度を与える。

ミオシンATPアーゼとは無関係にADP産生を測定するためのNPEケージ化ADPを用いる筋繊維の同様の実験は、(i) リン酸化酵素が、筋繊維内にある場合ADPについてその感受性及び反応性を維持することができ、(ii) シグナルがミオシンATPアーゼから放出されるADPを検出可能であり、(iii) 筋繊維が期待される様式で発達中の張力 (developing tension) であることを示す。

【0025】

ヒトのRhoタンパク質由来のヌクレオチド交換

小さなGタンパク質、rho (GTPアーゼ活性をも有する) 由来のヌクレオチド交換の速度は溶液中で測定した。また、加水分解の速度は間接的に得た。

ヒトのrhoタンパク質は密接に接合したGDPを含む形態で調製した。過剰に加えたGTPの存在下で、ヌクレオチド交換は、本発明に従って測定される場合、GDPが遊離溶液 (free solution) に放出されるように生じる。一度GTPがrhoと結合す

ると、その加水分解はタンパク質によって定常状態の速度でゆっくり触媒される。これはより多くのGDPを産生し、それが一度放出されれば測定される。

蛍光発光は20mMのトリス/HCl, pH 7.6, 1mMのMgCl₂, 100mMの(NH₄)₂SO₄, 10 μ MのGTP及び2 μ MのIDCC-NDPK~Pを含む200 μ lの溶液で記録した。反応は2 μ MのRho.GDPを添加することによってt=0で開始した。励起は475nmに設定した発光モノクロメーターにより440nmであった。温度は30℃であった。データは異なるGTP/GDP比によるIDCC-NDPK~Pの滴定から得られる1 μ MのGDPについて蛍光変化を用いて規格化した。データ(図8)は対数期で0.196min⁻¹の速度定数及び線形期で41.2nM GDP min⁻¹の傾き([Rho]による分割後、3.43 $\times 10^{-4}$ s⁻¹)を有するシングル指数関数+一次関数にフィットさせた。指数関数“バースト”はrhoに結合したGDPとGTPとの交換を表す。線形期は定常状態を表し、さらにrho上へのGTPの交換はGDPへの加水分解によって制限される。

また、速度は‘標準’方法によっても測定し、同様の結果を得た。

本発明は上記で実施例のみによって記載され、改良は本発明の範囲及び意図に含まれる限りにおいて行ってもよいことは理解されるであろう。

【0026】

参考文献(その内容は全体として本明細書に組み込まれるものとする)

1. Holmsen et al. (1972) Anal. Biochem. 46: 489-501.
2. Kimmich et al. (1975) Anal Biochem 69: 187-206.
3. Loxdale (1976) J Physiol (Lond) 240-4P-5P.
4. Spielmann et al. (1981) Anal Biochem 113: 172-178.
5. Feradui et al. (1981) Int J Sports Med 2: 106-109.
6. Brovko et al. (1994) Anal Biochem 220: 410-414.
7. Schultz et al. (1993) Anal Biochem 215: 302-304.
8. Tornheim & Schultz (1993) Anal Biochem 211: 329-330.
9. Pogson et al. (1979) Int J Biochem 10: 995-1000.
10. de Azeredo et al. (1979) Anal Biochem 95: 512-519.
11. Sato et al. (1983) Anal Biochem 135: 431-435.
12. Goswami & Pande (1984) J Biochem Biophys Methods 9: 143-151.

13. Cerpovicz & Ochs (1991) *Anal Biochem* 192: 197-202.
14. Brindle et al. (1990) *Biochem* 29: 3295-3302.
15. Petersen et al. (1990) *Biochim Biophys Acta* 1035: 169-174.
16. Williams et al. (1993) *J Mol Biol* 234: 1230-1247.
17. Morera et al. (1995) *Biochemistry* 34: 11062-11070.
18. Schaertl et al. (1998) *J Biol Chem* 273: 5662-5669.
19. Sundin et al. (1996) *J. Bacteriol* 178: 7120-7128.
20. Izumiya & Yamamoto (1995) *J Biol Chem* 270: 27859-27864.
21. Corrie (1994) *J Chem Soc, Perkin Trans 1*: 2975-2982.
22. Parks & Agarwal in *The Enzymes*, 3rd ed (ed. Boyer). 8: 307-333.
23. Agarwal et al. (1978) *Methods Enzymol* 51: 376-386.
24. Jong & Ma (1991) *Arch Biochem Biophys* 291: 241-246.
25. Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning - a laboratory manual*.
26. Munoz-Dorado et al. (1990) *J Biol Chem* 265: 2702-2706.
27. Munoz-Dorado et al. (1990) *J Biol Chem* 265: 2707-2712.
28. Olsen et al. (1993) *Meth Enzymol* 217: 189-217.
29. Kindly provided by Dr R Williams, Cambridge.
30. Almaula et al. (1995) *J Bacteriol* 177: 2524-2529.
31. Fletcher & Bliss (1978) *Appl Phys* 16: 289-295.
32. He et al. (1997) *J. Physiol.* 501.1: 125-148.

【図面の簡単な説明】

【図1】

好ましい蛍光性標識、IDCCの構造を示す。

【図2】

(A) ADP/ATP及び(B) GDP/GTPの存在下でIDCC-NDPKの発光スペクトルを示す。

【図3】

ADP/GDP (白抜き記号○及び□) 及びATP/GTP (黒塗り記号○及び□) によるIDCC標識リン酸化酵素の滴定を示す。

【図4】

非リン酸化酵素を用いた同じ実験を示す。

【図5】

蛍光変化がADP濃度に対してどのように変化するかを示す、ストップフロー実験で得られる校正曲線を示す。

【図6】

ストップフロー蛍光を用いて得られた過渡的動力学的数据を示す。破線はシングル指数関数のベストフィットを表す。6 A及び6 BはADP及びATPで得られたデータを示す。6 CはADP (○) 又はATP (○) 濃度に対して得られた速度定数のプロットを示す。実線は導出した二次速度定数を有する一次方程式のベストフィットを示す。破線及び四角 (□) は、ADP滴定が1mMのATPの存在下で繰り返された場合に得られた観測された速度定数を示す。

【図7】

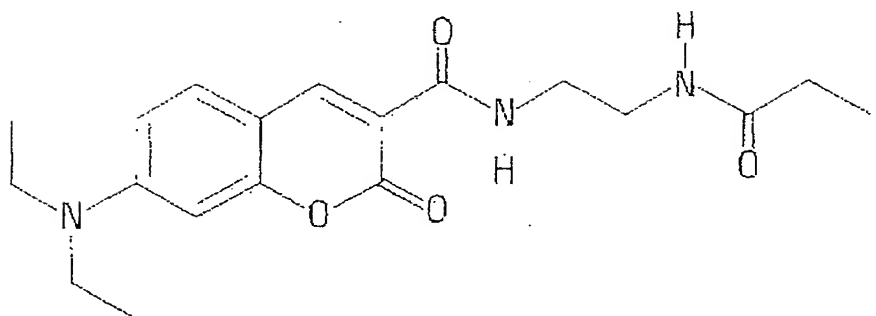
筋肉張力の増加及びIDCC-NDPK-Pの脱リン酸化のための蛍光の付随的な減少を示す、シングルラビット腰筋筋繊維 (single rabbit psoas muscle fibre) (除膜した) から得られるプロットを示す。

【図8】

溶液中へのGDPの放出を示す、ヒトのロータンパク質 (rho protein) を用いて得られたプロットを示す。データは、実線で示されるようにシングル指数関数+一次方程式にフィットさせた。

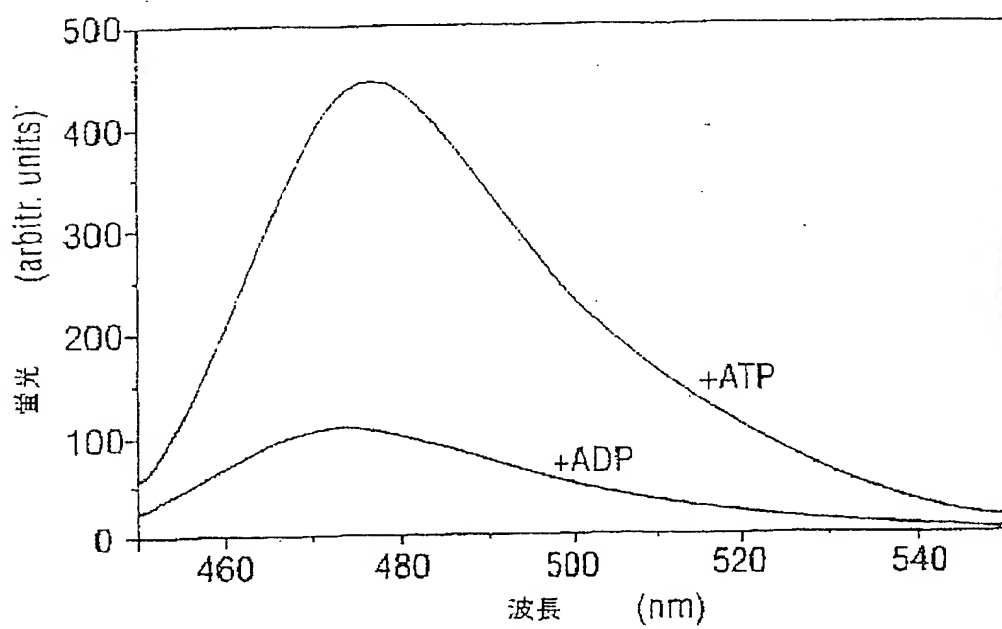
【図1】

Fig. 1



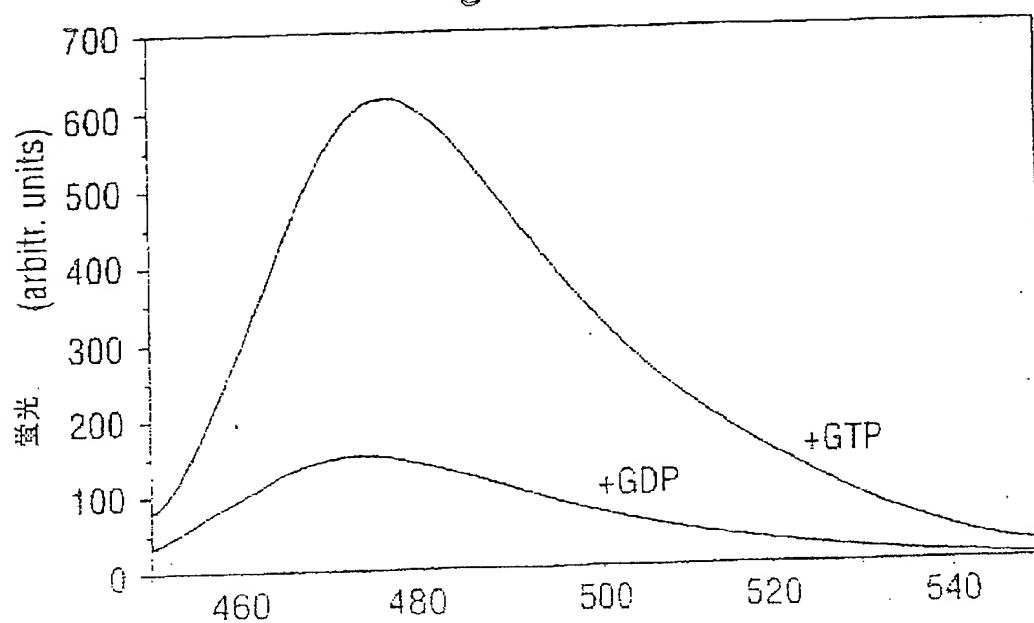
【図2A】

Fig. 2A



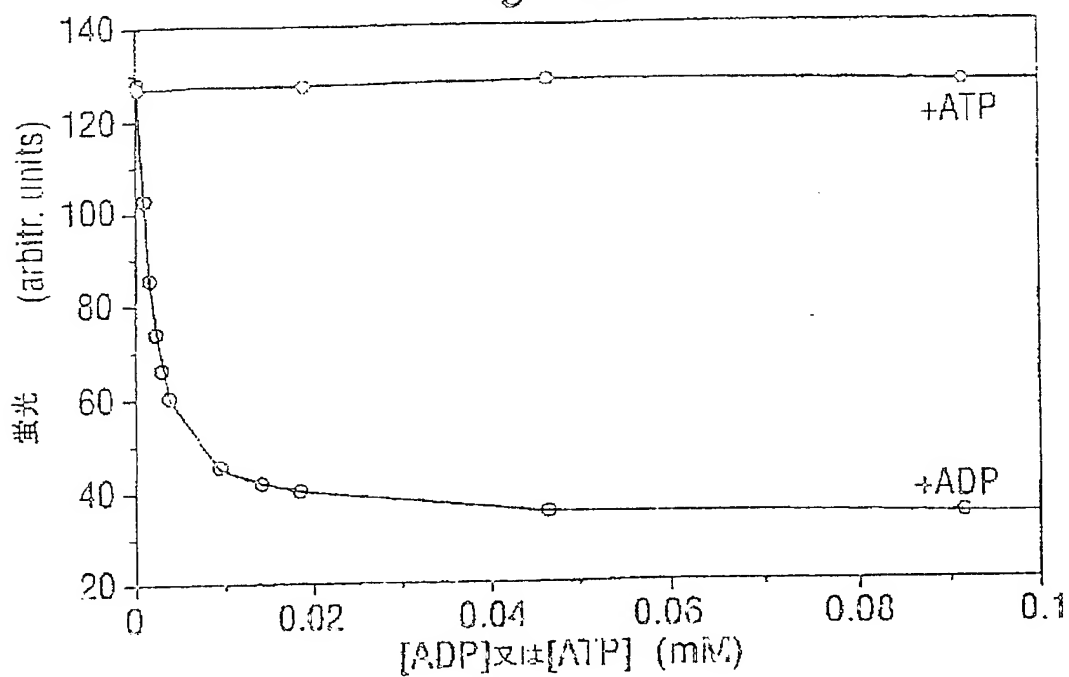
【図 2 B】

Fig. 2B

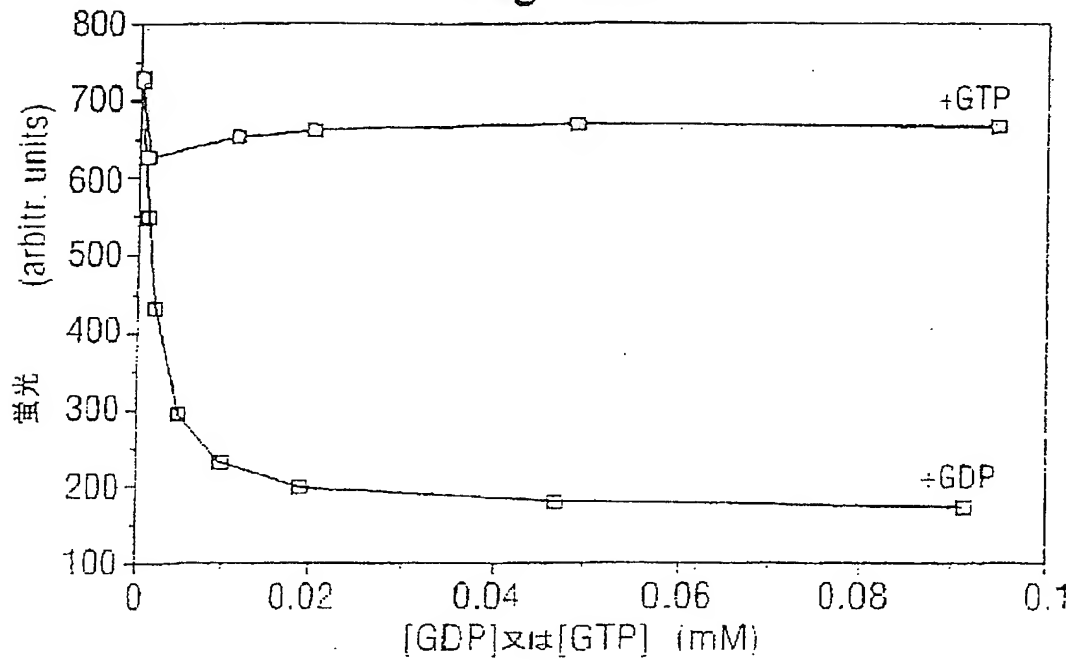


【図 3 A】

Fig. 3A

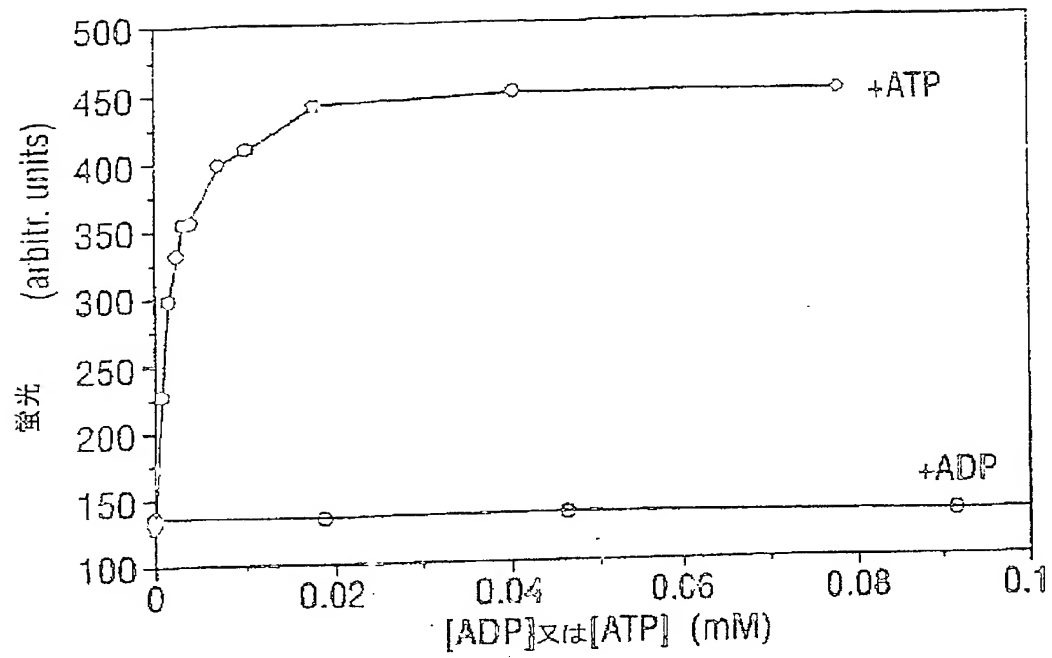


【図3B】

Fig. 3B

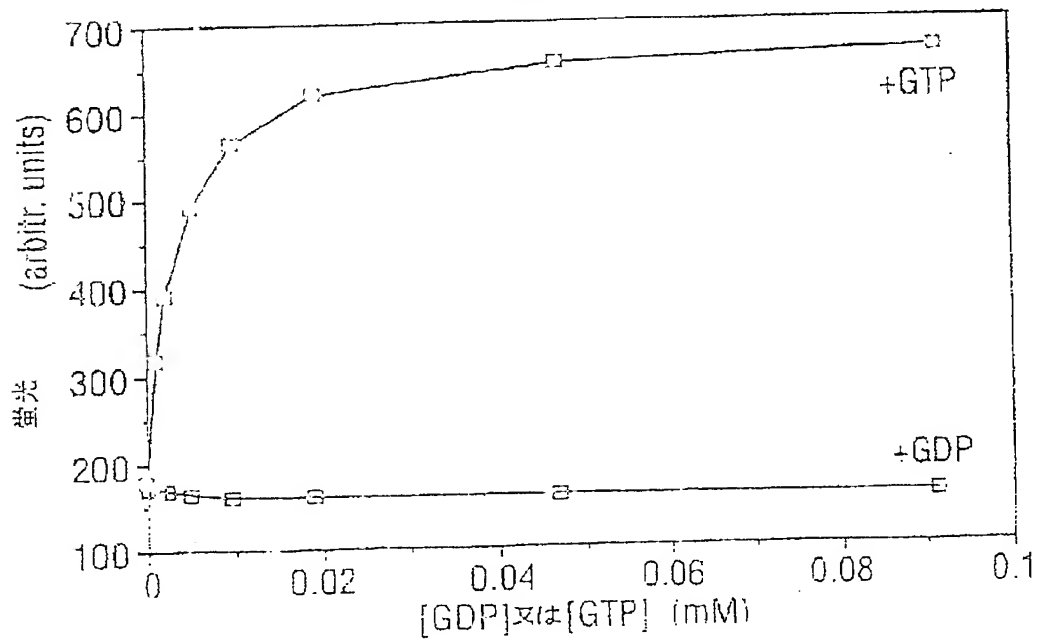
【図4A】

Fig. 4A



【図4B】

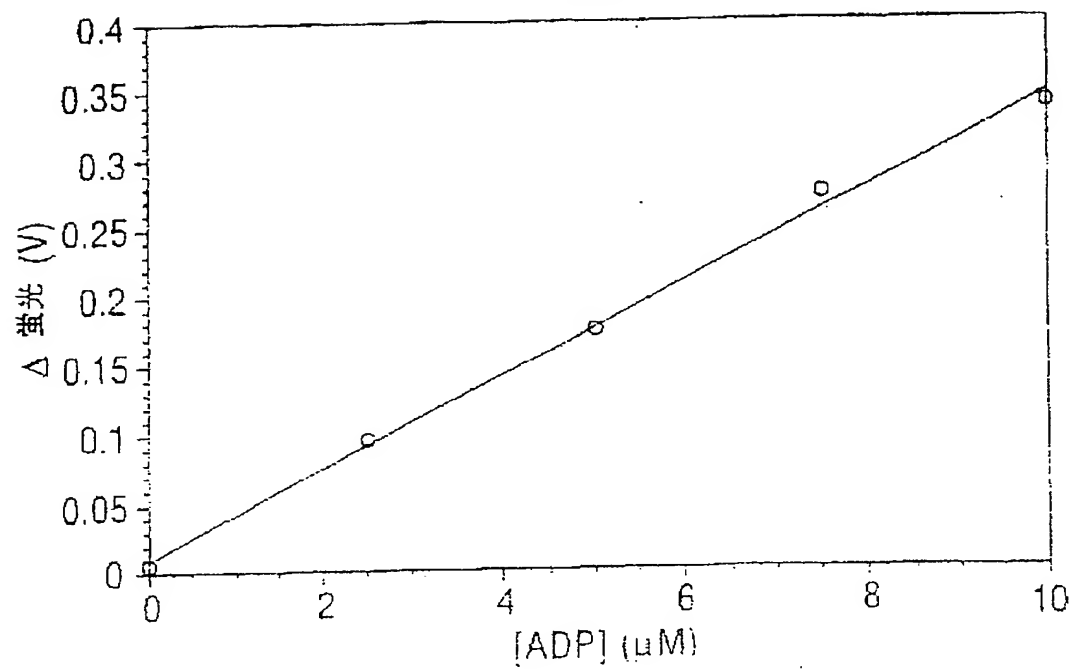
Fig. 4B



【図5】

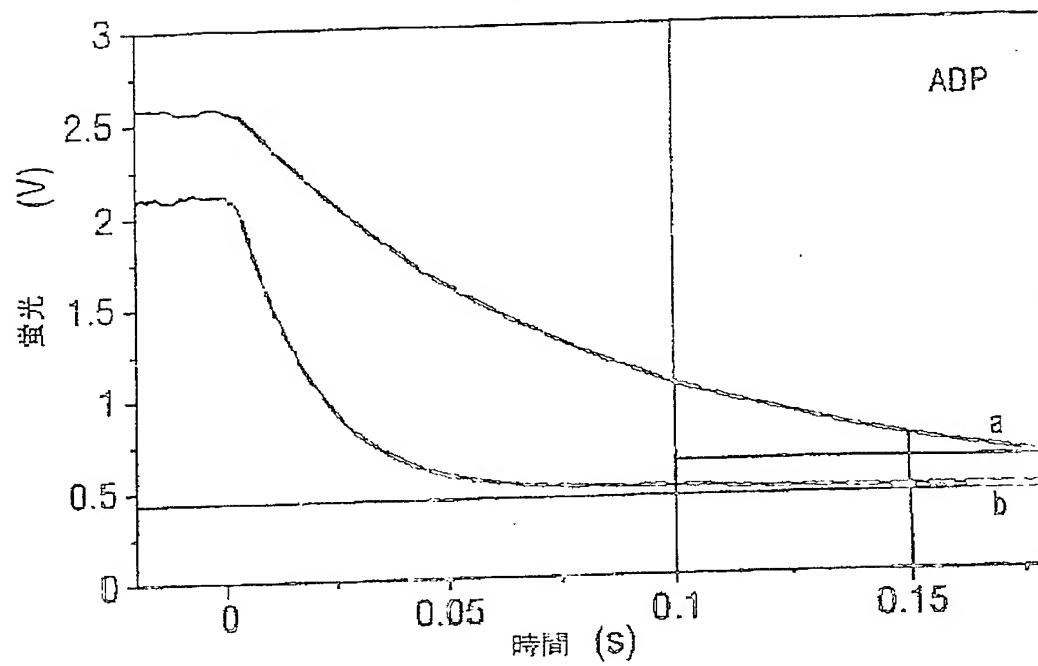
Fig. 5

校正



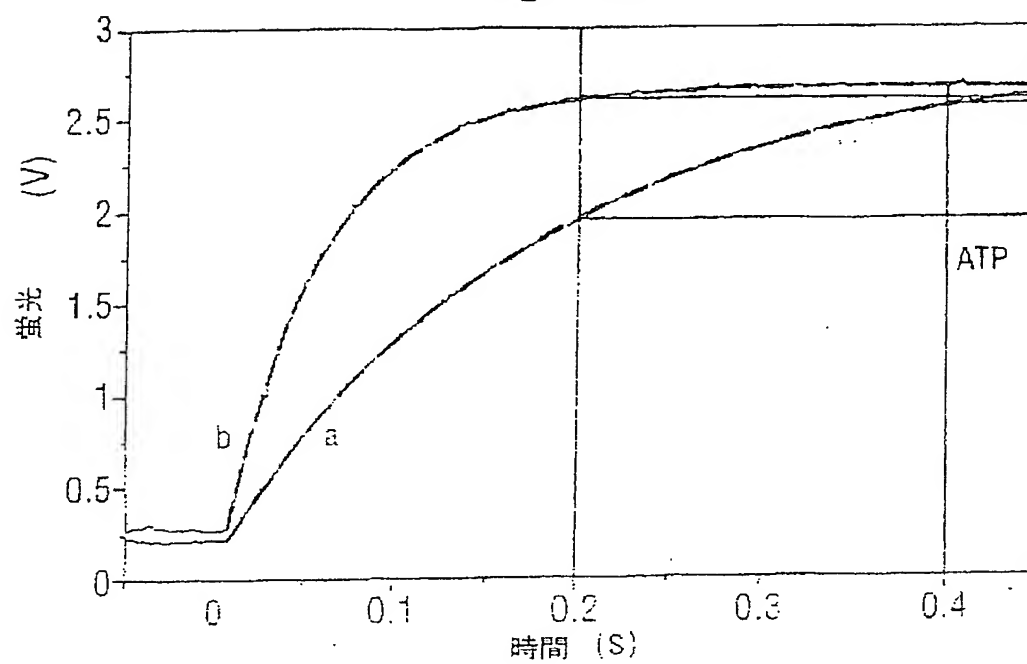
【図 6 A】

Fig. 6A



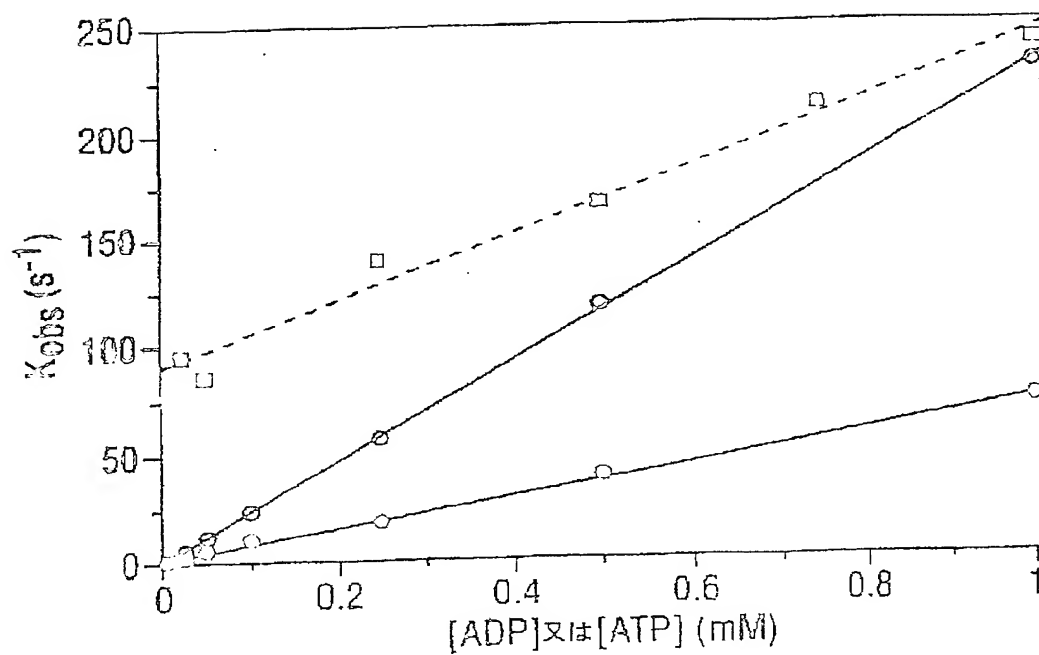
【図 6 B】

Fig. 6B



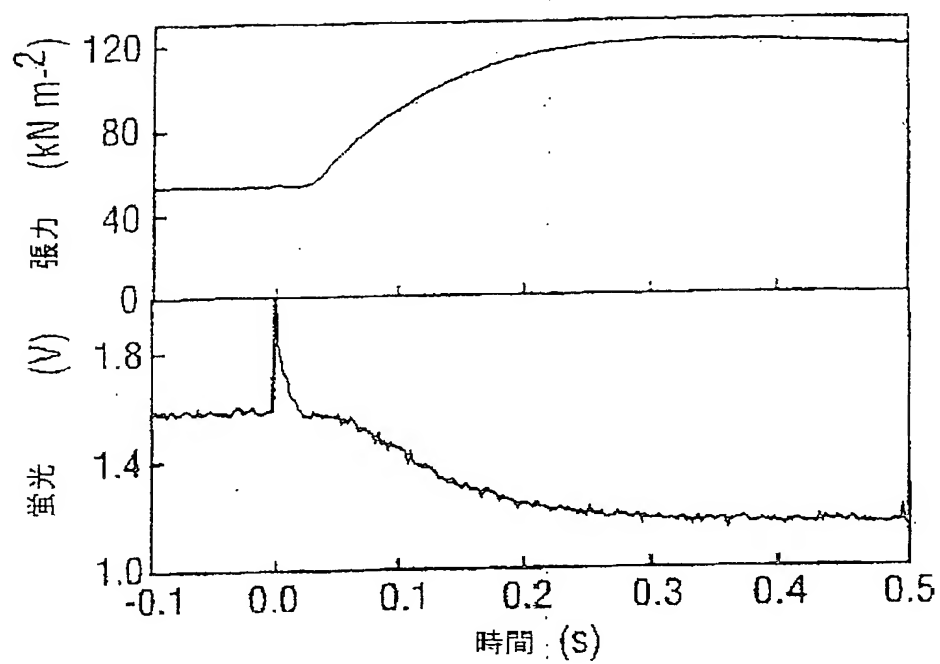
【図6C】

Fig. 6C



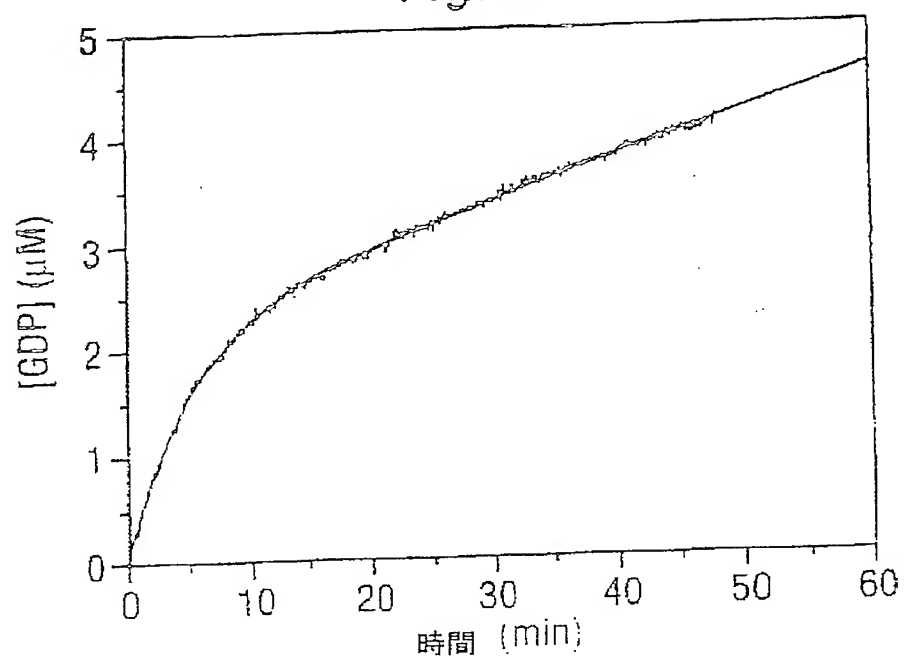
【図7】

Fig. 7



【図8】

Fig. 8



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 00/01740

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/48 C12N9/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q G01N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPD-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 00 52467 A (UNIV DUNDEE ; MEHTA ANIL (GB); MUIRMO RICHMOND (GB)) 8 September 2000 (2000-09-08) claims 1-3 page 2, line 14-17 page 16, line 21 - page 18, line 13 page 24, line 22 - line 25	1-3, 10
X	US 5 741 635 A (GUHA ABHIJIT ET AL) 21 April 1998 (1998-04-21) claims 1, 2, 5 column 3, line 41 - line 44 column 8, line 45 - column 9, line 6 column 9, line 49 - column 10, line 1 column 10, line 35 - line 51 column 11, line 46 - line 63	1-3, 8-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (see specification)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 October 2000

Date of mailing of the international search report

13/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 5518 Reimsplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 890 n.
Fax: (+31-70) 340-2018

Authorized officer

Routledge, 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 00/01740

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 923 796 A (DENEKE ULFERT ET AL) 8 May 1990 (1990-05-08) claims column 5, line 61 - column 6, line 14 table 1 examples 7-10	1-3,8-10
X	US 4 806 415 A (FOSSATI PIERO) 21 February 1989 (1989-02-21) column 3, line 60 - line 64 column 4, line 56 - line 58	1-3,8-10
X	FR 2 660 933 A (PASTEUR INSTITUT) 18 October 1991 (1991-10-18) claims 1-4,7 page 2, line 29 - line 35 page 3, line 10 - line 23	1-3,8-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 00/01740

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0052467 A	08-09-2000	NONE	
US 5741635 A	21-04-1998	NONE	
JS 4923796 A	08-05-1990	DE 2834704 A	21-02-1980
		AT 362532 B	25-05-1981
		AT 426079 A	15-10-1980
		AU 514885 B	05-03-1981
		AU 4927579 A	14-02-1980
		CA 1129316 A	10-08-1982
		DD 145328 A	03-12-1980
		DE 2960532 D	29-10-1981
		DK 315679 A	09-02-1980
		EP 0009076 A	02-04-1980
		JP 1171163 C	17-10-1983
		JP 55026896 A	26-02-1980
		JP 58004915 B	28-01-1983
		YU 191479 A	31-08-1984
US 4806415 A	21-02-1989	IT 1172385 E	18-06-1987
		AT 45983 T	15-09-1989
		AU 555501 B	25-09-1986
		AU 3492884 A	27-06-1985
		CA 1227113 A	22-09-1987
		DE 3479594 D	05-10-1989
		EP 0147713 A	10-07-1985
		JP 1615821 C	30-08-1991
		JP 2040320 B	11-09-1990
		JP 60156400 A	16-08-1985
FR 2660933 A	18-10-1991	EP 0498849 A	19-08-1992
		WO 9106671 A	16-05-1991

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

ページ (参考)

(C 1 2 N 9/12

C 1 2 R 1:01

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 Q 1/48

C 1 2 R 1:01)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, C N, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, K P, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, S G, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 コリー ジョン エドガー トマス

イギリス ロンドン エヌダブリュー7

1エイエイ ミル ヒル ザ リッジウェ

イ ナショナル インスティテュート フ

ォア メディカル リサーチ (番地な

し)

(72)発明者 ウェブ マーティン ロナルド

イギリス ロンドン エヌダブリュー7

1エイエイ ミル ヒル ザ リッジウェ

イ ナショナル インスティテュート フ

ォア メディカル リサーチ (番地な

し)

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA03 DA02 LA01

GA07 GR21 KA02 KA03 LA01

2G045 DA15 FA29 FB01 FB07 GC10

GC15

4B050 CC02 CC03 DD02 FF05F

FF11E LL03

4B053 QA01 QA20 QC03 QM15 QM27

QR56 QS03 QX02

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Said detection approach which is an approach of detecting existence of the nucleoside diphosphate in a sample, and includes the process which detects the dephosphorization of the phosphoenzyme gestalt of the nucleoside diphosphatekinase (NDPK).

[Claim 2] Said detection approach which is an approach of detecting existence of the nucleoside triphosphate in a sample, and includes the process which detects the phosphorylation to the phosphoenzyme gestalt of the nucleoside diphosphatekinase (NDPK).

[Claim 3] The 1st term of a claim which detects phosphorylation or dephosphorization using the property of the proper of NDPK, or an approach given in the 2nd term.

[Claim 4] The 1st term of a claim which changes NDPK so that it may have the indicator which gives a detectable signal which is different by the case where non-phosphorylation is carried out to the case where phosphorylation of the enzyme is carried out, or an approach given in the 2nd term.

[Claim 5] The approach given in the 4th term of a claim NDPK has a fluorescence indicator.

[Claim 6] The approach given in the 5th term of a claim which the fluorescence indicator has combined with NDPK by cysteine residue.

[Claim 7] The 5th term of a claim whose fluorescence indicator is IDCC (N-[2-(iodoacetamide) ethyl]-7-diethylamino coumarin-3-carboxamide), or an approach given in the 6th term.

[Claim 8] The approach given in the 1st term of a claim the nucleoside diphosphate is ADP or GDP.

[Claim 9] The approach given in the 2nd term of a claim the nucleoside triphosphate is ATP or GTP.

[Claim 10] The approach of the 1st term of a claim to the 9th term which is the quantitative approach given in any 1 term.

[Claim 11] The approach of the 1st term of a claim to the 10th term which is NDPK of Myxococcus xanthus to which NDPK has Asp112 ->Cys mutation and has an IDCC indicator in this residue that carried out mutation given in any 1 term.

[Claim 12] NDPK embellished so that it might have the indicator which gives a detectable signal which is different by the case where non-phosphorylation is carried out to the case where phosphorylation of the enzyme is carried out.

[Claim 13] NDPK given in the 12th term of a claim the given indicator of embellished NDPK is a fluorescence indicator.

[Claim 14] NDPK given in the 13th term of a claim which the fluorescence indicator has combined with NDPK by cysteine residue.

[Claim 15] NDPK the 13th term of a claim whose fluorescence indicator is IDCC, or given in the 14th term.

[Claim 16] NDPK of Myxococcus xanthus which has Asp112 ->Cys mutation and has an IDCC indicator in this residue that carried out mutation.

[Claim 17] NDPK embellished by association of the indicator which has susceptibility in association of the nucleoside diphosphate, and in which at least one detection is possible.

[Claim 18] The substrate which has NDPK of the 12th term of a claim to the 17th fixed term given in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

any 1 term.

[Claim 19] in NDPK of the 12th term of a claim to the 17th term for using it as vivo or an in vitro diagnostic reagent given in any 1 term.

[Translation done.]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

As for the content of all the documents quoted on these descriptions, the whole shall be incorporated here.

Field of invention This invention relates to the assay for the assay for the nucleoside diphosphate, especially ADP and GDP and the nucleoside triphosphate, especially ATP and GTP.

Background technique The nucleoside diphosphate and triphosphate play an important role in biology. ADP is a direct precursor for forming ATP, and is the common negotiation object of the energy in cells (the universal currency of cellular energy). GDP is a substrate for succinyl-CoA synthetase, is the key enzyme of the Krebs cycle and is formed in the case of the glyconeogenesis by phosphoenolpyruvate carboxykinase. Moreover, it is indispensable also in G-protein signal transfer, microtubule growth, and vision excitation. UDP is related to epimerization to the glucose of a galactose, formation of a sucrose, and growth of glycogen. CDP is an important radical in composition of phosphoglyceride. Moreover, the nucleoside diphosphate is produced by many cell processes which are the products of the reaction in which a catalyst is carried out by some main classes of enzymes, such as triphosphatase and a kinase, therefore include maneuverability, muscle contraction, DNA synthesis, an imprint, a translation, and nitrogen fixation.

[0002]

Thus, detection and measurement of the nucleoside diphosphate and triphosphate are important in biology and metabolic research, especially bioenergetics.

[1, 2, 3, and 4, for example, reference, by which the assay of ADP and ATP of the biological sample based on luciferase is known between things for 20 years or more --] . The 3 enzyme bioluminescence system which the bioluminescence assay of ADP and ATP is indicated for the object of the activity in muscles and a fat tissue biopsy, and uses [5] and luciferase is reported for the object of the activity in a bacterial cell extract [6]. Although the bioluminescence ADP assay optimized for the activity by the high ATP:ADP ratio is reported, [7] and this need enzyme clearance of ATP. Generally, it is easier than measuring ADP under existence of ATP to measure ATP under existence of ADP.

Moreover, enzyme spectrophotometric analysis assay is also indicated [8 [for example,]].

Moreover, the assay of GDP and GTP of a biological sample is also known well [for example, the reference 9 and 10].

Reference 11 indicates the column base chromatography assay of ADP, GDP, CDP, and UDP.

Moreover, the radioactive assay of GDP and GTP is also indicated [12, 13]. in It is used, in order that the NMR base assay for measurement of vivo ADP level may be known about yeast and [14] and NMR may measure ADP, ATP, and an erythrocyte [15].

[0003]

Disclosure of invention According to this invention, the nucleoside diphosphate is detected or measured by the dephosphorization reaction of the gestalt of the phosphorylated enzyme of the nucleoside diphosphatekinase (NDPK), and nucleotide triphosphate is detected or measured by the phosphorylation

THIS PAGE BLANK (USPTO)

of NDPK to the gestalt of the phosphorylated enzyme.

Thus, this invention offers the detection approach of the existence of the nucleoside triphosphate including the process which detects the phosphorylation to the gestalt of the detection approach of the existence of the nucleoside diphosphate including the process which detects the dephosphorization reaction of the gestalt of the phosphoenzyme of (a) nucleoside diphosphatekinase in a sample, and the phosphoenzyme of (b) nucleoside diphosphatekinase in a sample.

This approach includes the following processes typically.

- the process which combines the nucleoside diphosphate in a sample with NDPK phosphoenzyme, or carries out phosphorylation of the NDPK to the nucleoside triphosphate in a sample -- and -- - Process which detects change of the description of an enzyme which carried out phosphorylation and is different between the gestalt which carried out dephosphorization.

[0004]

The vocabulary "NDPK" means the enzyme which has the transition to the nucleoside diphosphate (N2DP) of gamma-phosphoric-acid radical of the nucleoside triphosphate (N1TP) by the activity, i.e., the ping-pong mechanism, of the enzyme classified as EC 2.7.4.6.

$N1\ TP + N2DP \rightarrow N1\ DP + N2TP$ A trivial name is the "nucleoside diphosphatekinase" although the systematic name of NDPK is the "ATP:nucleoside-diphosphate phosphotransferase" based on this reaction scheme. Moreover, the enzyme is described to be a kinase (phosphorylation), the nucleoside diphosphate, a nucleoside 5' diphosphate kinase, a nucleoside-diphosphate (UDP) kinase, a nucleoside diphosphokinase, a nucleotide phosphate kinase, and NM23 by Oshi.

[0005]

NDPK is indicated about many living things (both a procaryote and eukaryote), for example, Homo sapiens, a cow, an ape, a mouse, a platanna, oat grass, a Pisum sativum, a potato, yeast, a Bacillus subtilis, Escherichia coli, Myxococcus xanthus, Tori's myeloblastosis virus, etc. These differences by a cell part, molecular weight, oligomer structure, the isoelectric point, reaction kinetics, a substrate priority (substrate preference), optimum pH, pH range, optimum temperature, cation demand nature (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , $calcium^{2+}$, etc.), and various isoforms are indicated. If the enzyme for which available versatility was suitable is taken into consideration, this contractor can choose easily NDPK suitable for a certain specific situation, and can refine it. Using the ping-pong mechanism which moves gamma-phosphate to an active site histidine from the nucleoside triphosphate (N1TP), a NDPK enzyme forms phosphoenzyme intermediate and, subsequently forms the nucleoside diphosphate (N2DP). This invention is based on discovery by being stable over the time scale with which phosphoenzyme intermediate gives the detection and measurement. By phosphoenzyme intermediate, the enzyme of others which carry out phosphorylation of the nucleoside diphosphate by the single bonding site of a nucleotide preferably may also be used by this invention.

[0006]

Phosphoenzyme can move the phosphoric-acid radical to N2DP in a sample, and can form corresponding N2TP. Therefore, detection of this migration is applicable to detection of the nucleoside diphosphate. Therefore, in order to detect the nucleoside diphosphate according to this invention, phosphoenzyme is required as a reagent. This can form NDPK easily superfluous NTP and by incubating with ATP typically. In this approach, formation of phosphoenzyme is promoted by removing Mg^{2+} using EDTA [16]. Moreover, the chemical phosphorylation of a histidine may be used, using a phospho lamination date (phosphoramidate) as a phosphorylation reagent [17].

Phosphoenzyme can be isolated in order to use it as a reagent. It turned out that phosphoenzyme can be stored on ice for a long time than 48 hours without carrying out dephosphorization, and it can store at -80 degrees C for a long period of time (at least five months) (even if freeze thawing repeated even if produced dephosphorization). The stability of phosphoenzyme longer than the time amount range required for the preparation is especially advantageous in order to act as the monitor of the dynamical phenomena, such as bleedoff of ADP of the ATPase origin, after that.

[0007]

When it adds to the sample containing NDP, dephosphorization of the phosphoenzyme is carried out by

THIS PAGE BLANK (USPTO)

migration to NDP of the phosphoric-acid radical. When it adds to the sample containing NTP, phosphoenzyme is formed of migration to the enzyme of a NTPgamma-phosphoric-acid radical. It depends for this invention on the capacity to identify between the gestalten of the phosphorylation of NDPK, and dephosphorization.

In order to identify the gestalt of the phosphorylation of NDPK, and dephosphorization, a suitable measurable change of arbitration can be used.

For example, the property of the proper of an enzyme can be used. It is the example which showed how the following approaches would detect dephosphorization/phosphorylation depending on specific NDPK chosen by the level from which sensibility differs.

- The location of phosphate can be checked with ^{31}P NMR spectrum as association with NDPK, or gamma-phosphate of NTP namely,.
- The proton from which the environment changes with dephosphorization is detectable with NMR.
- Dephosphorization may produce change of the fluorescence of proteinic tryptophan residue [for example, the reference 18].
- Dephosphorization is detectable with reduction of the phosphoenzyme origin which carried out the radiolabel of ^{32}P . Radioisotope is incorporable into NDPK with sufficient convenience using [gamma- ^{32}P] ATP.
- Circular dichroism or the suitable spectrometry approach of others of arbitration can detect conformation change which takes place by dephosphorization.
- Dephosphorization may produce change of a surface plasmon resonance property as a result.

[0008]

It is more desirable to embellish an enzyme anyhow rather than using a property peculiar to a wild type enzyme. Moreover, this is important when a measurable change of the proper to which dephosphorization of selected NDPK is performed easily is not shown.

Especially one desirable qualification is addition to the enzyme of fluorescent labeling by cysteine residue typically. When there is no suitable cysteine residue for wild type protein (for example, NDPK of *Myxococcus xanthus*), this can be easily introduced by mutation [19 [for example,]]. This contractor can determine the suitable location for mutation easily, and guarantees that the top mutation does not disturb the activity of an enzyme [20 [for example,]]. In addition to this by the amino acid residue to which arbitration was given, a specific indicator may give a result also with a sufficient twist. A routine experiment can determine an indicator and a suitable combination of residue.

[0009]

A desirable fluorescence indicator uses a coumarin content compound (around coumarin) as the base. Especially, preferably, it is the N-[2-(iodoacetamide) ethyl]-7-diethylamino coumarin-3-carboxamide, and is simply referred to as 'IDCC' [21; [drawing 1](#)] and henceforth. As for this, combining with cysteine residue is desirable, and when phosphorylation of the NDPK is carried out and dephosphorization of the NDPK is carried out in strong fluorescence, it is desirable that weak fluorescence is shown. When it combines with NDPK suitably, this indicator offers the advantage to which phosphoenzyme can detect little ADP under existence of ATP of far high concentration. This is very need in the situation that ATP level is high, because of an experiment in the muscle fiber of a single. Moreover, it can react very quickly to change of ADP level, and gives the big signal change exceeding the range of hundreds micromole.

As an indicator of others which can be introduced by the same approach, an ESR indicator, a luminescence indicator, a phosphorescence indicator, and other suitable chromophores are mentioned. It will be understood that some of various options with this available contractor are suitable for real time from the thing of others for detecting the phosphorylation/dephosphorization of an enzyme. Although fluorescence is considerably suitable for real-time detection, the approach that a radiolabel is used is suitable measuring a terminal point.

[0010]

The nucleoside diphosphate/triphosphate by which assay is carried out must be the substrates of NDPK used. [, 22, 23, and 24, ADP, CDP, GDP, UDP, IDP, XDP(s), those deoxy derivatives (for example,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

dADP, dCDP, dGDP, dTDP, dUDP), 6-aza--UDP, 8-BUROMO-IDP, 8-aza--GDP, 8-aza--UDP, and adenosine 5'-methylene diphosphonate are indicated to be as various NDP substrates --] . [for example,] phosphorylation of each of these compounds is carried out by various reaction compatibility and reaction kinetics NDPK and the substrate which are used -- depending -- with phosphoenzyme, and they can carry out assay according to this invention in this way by them.

Since preferably detects and measures ADP or GDP, it is used by this invention. Therefore, NDPK which shows selectivity to one of the substrates of these is chosen.

[0011]

In the desirable embodiment of this invention, this detection approach gives quantitative data, namely, this invention gives the quantification approach of the nucleoside diphosphate in a sample, or triphosphate. Typically, this includes the process related to change of the description which can detect NDPK to the concentration of NDP or NTP. It will be understood that this may require the comparison with the calibration (measurement of dephosphorization with fluorescence indicators, such as IDDC) or criterion which should be performed. A calibration is typically performed in the range for which the concentration measured asks.

In the first quantitative aspect of affairs, the amount of the nucleoside diphosphate or the nucleoside triphosphate is determined by measuring the reduction (NDP) or the increment (NTP) in the level of phosphorylated enzyme after addition of the phosphorylated enzyme (NDP) to a sample, or non-phosphorylated enzyme (NTP).

In the second quantitative aspect of affairs, the reduction (NDP) or the increment (NTP) in level in the phosphorylated enzyme to time amount can determine the production rate of the nucleoside diphosphate or triphosphate. By fitting [measured value / mathematical model / (for example, simple model based on primary exponential reduction) / suitable], the production rate of the nucleoside diphosphate or triphosphate can be determined. As for the dephosphorization of phosphoenzyme (NDP), or the phosphorylation of an enzyme (NTP), in this aspect of affairs, being measured using the real-time detecting method is desirable.

[0012]

As for the approach of this invention, it is desirable that it is suitable for the activity of in vivo or in vitro. As for this approach, it is desirable that it is suitable for the activity of in SAITSU of a muscle fiber, and it is desirable to give the data suitable for calculating the ADP bleedoff rate from an actomyosin.

The initial process which adds NDPK phosphoenzyme to an interested sample is usually in this approach by ** like the process (NDP related aspect of affairs) which detects the dephosphorization of phosphoenzyme. This may be preceded with preparing phosphoenzyme from non-phosphorylation NDPK.

Moreover, this approach may also include the process which analyzes the data of the arbitration obtained in the case of approaches, such as applying data to a formula, in order to draw a quantitative value.

Preferably, this approach avoids the activity of reagents, such as theophylline which may check NDPK activity, DESUDAMIN (desdanine), and Ag⁺.

[0013]

This invention offers the reagent for the activity in this approach like an above-mentioned approach. This invention offers NDPK embellished so that it may have the indicator which gives a detectable signal which is different by the case where non-phosphorylation is carried out to the case where phosphorylation of the enzyme is carried out.

The indicator of embellished NDPK may be a fluorescence radical and is IDCC preferably. The indicator is typically combined with the amino acid residue of an enzyme. It is desirable to combine an indicator with cysteine residue.

Especially a desirable reagent is NDPK of *M.xanthus* which has Asp112 ->Cys mutation and has an IDCC indicator in this residue that carried out mutation. This reagent as phosphoenzyme has susceptibility more higher than ATP in the magnitude of about 3 order to ADP.

Moreover, this invention offers NDPK embellished by association of the indicator which has

THIS PAGE BLANK (USPTO)

susceptibility in association of the nucleoside diphosphate, and in which at least one detection is possible.

Moreover, this invention offers the substrate which has these NDPK reagents fixed there. These contain a column or a bead. This may be used combining ^{32}P -phosphorylated enzyme, and the radiolabel of the ADP in the sample which incubates with fixed NDPK is carried out to the conversion to ATP.

Therefore, activity shows the amount of ADP in the first sample in an isolation solution (free solution).

Moreover, this invention offers the production approach of these NDPK reagents.

Furthermore, this invention offers these NDPK reagents for the activity as a reagent on in vivo or an in vitro diagnosis.

[0014]

Example General molecule biological technique was performed according to Sambrook and others [25]. Preparation of NDPK NDPK of *M.Xanthus* is cloned in *Escherichia coli* and a code is carried out by the ndk gene discovered [26]. Protein is the gay tetramer of 16kDa subunit, and is characterized, and the crystal structure is determined [16, 27]. Since the wild type array does not contain the cysteine of arbitration, a gene is operated in order to introduce cysteine residue using the phospho thioate base method [produced with the gestalt of the kit by 28 and Amersham], or an PCR base quick change kit [Stratagene] by the site-directed mutagenesis of the *Escherichia coli* stock TG 1 and DH5alpha.

The recombination clone which combined the 0.8 kb HindIII-EcoRI fragmentation [29] of pJM5C2A containing the ndk gene of the *M.xanthus* origin with M13mp19, and was obtained was used using the Amersham kit, and the single stranded DNA template was offered for mutation. For cloning, the ndk gene which carried out mutation was returned and cloned to pJM5C2A (cloned back into). As another thing, they are 0.7 kb BstXI-EcoRI of an M13ndk structure. Fragmentation was combined with the gestalt with which the in vitro gene (trademark) pRSetA expression vector was embellished, and the coding of the array for the histidine tag united with the amino terminal of NDPK was removed. This produces 3.5kb pRSndkX sequences of a plasmid, and the last "X" is the number of a series of ndk mutation here.

Moreover, pRSndk was used as a template of the quick changing method.

[0015]

The various mutant protein containing the cysteine residue containing D112C (that is, mutation of Asp-112 was carried out to Cys) and D62C was prepared. The location for mutation was typically chosen based on the contiguity section of the nucleotide join interval spare time seen in a crystal structure [16]. The mutant D112 C gene was produced by the plasmid pRSndk4, and it was used for the manifestation. About the best result, it was used for starter culture of the cell which newly transformed. 200microl calcium competent BL21 cell [Novagen] was incubated by the pRSndk4 plasmid DNA of 2ng(s) in Hikami during 30 minutes. Subsequently, the one half of this mixture was wound around LB agar plate containing 0.1mg [/ml] ampicillin, and it incubated at 37 degrees C overnight. The plate contained the colony of 50 to 100 typically. The colony of 2-3 was inoculated into 100ml LB culture medium containing 0.1mg [/ml] ampicillin from the plate, it increased at 37 degrees C for 9 hours, and the unit cell went into the stationary phase. For the main culture, 8x500ml LB+ ampicillin was inoculated into 10ml initiation culture, it incubated at 37 degrees C for 6 hours, and the time amount after cell reached OD595 of 0.38 typically. At this event, 0.5mg [/ml] IPTG was added in each flask, and the cell was increased for further 16 hours. Beckmann L2 centrifuge recovered the cell by 3800rpm by carrying out at-long-intervals alignment separation at 20 degrees C for 20 minutes. The pellet was re-suspended in the 100ml buffer solution A (tris of 20mM - HCl, pH 8.2, 1mM EDTA), and it stored at -80 degrees C. Frozen about 35ml cell suspension was thawed slowly, and it dissolved by subsequently ultrasonicing. The supernatant (namely, crude extract) was held. SDS-PAGE determined manifestation level.

NDPKD112C produced more cytosol protein than 50%.

NDPK purification includes the process of two column chromatographies. After the ionic strength which used DTT of pH and buffer-solution A+10mM first adjusted, the crude extract (about 200ml) was put into 120ml Q-sepharose ion exchange column by the rate of flow of 4 degrees C and 2.0 ml/min. The buffer solution of one volume washed the column and it was eluted with the successive line form

THIS PAGE BLANK (USPTO)

inclination (500ml) of NaCl of 0.3M from 0 in the rate of flow of 1 ml/min. The bulk (about 80%) of NDPK is not combined with resin under these conditions.

[0016]

The effluent was put into the G-100 sepharose gel filtration column of the buffer solution A after the concentration using Amicon YM10 ultrafiltration membrane. By the rate of flow of 1.0 ml/min, the elution profile showed two peaks. The 1st contained the second protein including DNA. The fraction containing NDPK was stored and it condensed like the front.

It has the same array and it was checked that there is no mixing by Escherichia coli NDPK which is also a tetramer [30]. When mass analysis data showed that it is the single kind which has MW which mutant protein-amino terminal MECHIOSHIN calculated, and suiting MW 15993**1Da and refined protein discovered them within Escherichia coli, it was shown that it is missing [16]. The yield of pure NDPKD112C from 4l. culture was about 300mg.

[0017]

Fluorescence indicator of NDPK By IDCC (drawing_1) of an excessive amount, NDPKD112C was incubated at 37 degrees C 2.5 times in the tris/HCl of 50mM(s) (pH 8.1) for 1 hour. In the typical experiment, the volume of an indicator solution was 3ml and the concentration of NDPKD112C was 150microM. This solution was filtered with the Acrodisc filter (Gelman) of 0.2microM after the incubation, and it put into PD10 demineralization column (Pharmacia) made the balance with the buffer solution B (tris of 10mM - HCl, pH 8.0, EDTA of 1mM). Immediately, with the buffer solution B, the effluent (about 6ml) containing the protein which carried out the indicator was put into 25ml Q-sepharose column made the balance, and, subsequently to the linearity inclination of 20ml NaCl of 0.1M, was carried out from 0. It was eluted thoroughly and the protein which applied inclination and which carried out postlabeling was condensed by the same approach as the protein which has not carried out an indicator. Proteinic concentration was measured using absorbance spectroscopy, having assumed that a fluoro forehead's absorbance spectrum was eternal (epsilon430nm 46800M-1cm-1). The value of this concentration is in agreement with what was measured by the colorimetry assay which uses a bovine-serum-albumin calibration curve. After amending with the absorbance (it is the absorbance of 0.198 at 430nm(s) in a dithiothreitol addition product) of 276nm IDCC, the molar extinction coefficient of NDPK was calculated with epsilon276nm 7600M-1cm-1.

[0018]

The yield after an indicator and purification was 65% typically. It is shown that the thiol group of Cys-112 can use this high yield easily. One molecule IDCC was incorporated for every protein molecule, mass analysis showed clearly that the indicator of the second part is not shown, and mass was what is expected by IDCC-NDPK.

Mutation and labeling checked not acting on oligomer formation, and measured MW of complex according to sedimentation equilibrium centrifugal separation. A result shows that IDCC-NDPK is the tetramer of MW 62.7kDa (it is low 4% rather than it is calculated about a tetramer from mass analysis data).

When quick analysis of the fluorescence property of the combination of new mutant / fluoro forehead was required, typically, using the NDPK concentration of 100 to 200microl, labeling avoided the ultrafiltration and Q-sepharose process and the smaller scale performed it.

Thiol reactivity environmental susceptibility fluorescent labeling of others which were examined contained MDCC (N-[2-(1-MAREIMIJIRU) ethyl]-7-diethylamino coumarin-3-carboxamide) [21].

[0019]

Phosphorylation IDCC-NDPK was incubated with ATP of 1 or less mM, although 5 times were typically superfluous. The incubation was among EDTA of the tris of 10mM(s) / HCl, pH 8.0, and 1mM or PIPES of 10mM(s), pH 7.0, and EDTA of 1mM at 37 degrees C for 45 minutes from 30. It dissociated using PD10 column which equilibrated protein with the same buffer solution. Many were phosphoenzyme in 90% of the protein eluted typically. The solution was used, after were immediately alike or storing in Hikami till 48 hours. When required, the solution was condensed using the micro centrifugal separation concentrator.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[0020]

Fluorescence property The spectroscopy-property of phosphoenzyme (IDCC-NDPK-P) was compared with the enzyme of a non-phosphorylation gestalt. Data were recorded with the Perkin-Elmer LS50B emission spectrometer which has the monochromator slit width set as a xenon lamp and 2.5, or 5nm. The fluorescence of IDCC-NDPK was 4 times as large as the bottom of existence of ADP of 50microM under existence of ATP of 50microM (drawing 2 A). The same result was obtained by GDP/GTP of 100microM (drawing 2 B). In both cases, the spectrum was recorded at 20 degrees C from the solution of 200microl which contains the protein of 2microM in PIPES of 20mM(s), pH 7.2, and MgCl₂ of 2mM. Excitation was performed with 441nm and the slit width of 5nm. Amendment for a being [it / small **] volume change (1%) was not performed. These results show that IDCC-NDPK-P has strong fluorescence as compared with a non-phosphorylation gestalt.

[0021]

Although titration of the solution of IDCC-NDPK-P of 2microM which has ADP showed a big reduction of a fluorescence signal (drawing 3 A), it was changeless at the density range (<100microM) same in ATP. The same data were obtained by GDP/GTP (drawing 3 B). ADP/ATP assay was performed at 21 degrees C in the tris of 10mM(s) / HCl, pH 8.0, and MgCl₂ of 5mM. Excitation is 432nm (slit width of 5nm), and luminescence was recorded by 478nm (slit width of 2.5nm). GDP/GTP assay was performed at 20 degrees C in PIPES of 20mM(s), pH 7.0, and MgCl₂ of 2mM. Excitation is 441nm (slit width of 5nm), and luminescence was recorded by 475nm (slit width of 5nm). In both cases, data were amended for the small increment in the volume. In drawing 3 B, the small reduction by addition of the beginning of GTP is based on the partial hydrolysis of GTP in the preservation liquid of diluted 200microM, and subsequent GTP addition was from the preservation liquid of 2mM(s).

[0022]

It suggests that (drawing 4 A and 4B), and this are according to the phosphorylation/dephosphorization of an enzyme in almost all fluorescence change with the data of non-phosphorylated enzyme.

The increment exceeding 50microM in ADP produces the increment in small fluorescence. This is [18] and a thing probably depended on the nonspecific interaction of ADP and NDPK, as suggested about the wild type enzyme which does not label. Change of a fluorescence signal is [as opposed to / to at least 50% of protein concentration / [ADP]] linearity.

In order to lead quantitative data from fluorometry, the calibration curve shown in drawing 5 was plotted. The proofread data were obtained in the stop flow experiment by mixing ATP of 50microM containing ADP of IDCC-NDPK-P of 10microM, 0, 2.5, 5.0 and 7.5, or 10.0microM (the PIPES buffer of 10mM, pH 7.0, MgCl₂ of 1mM, 20 degrees C). The magnitude (ΔF) of fluorescence change averaged two experiments by each concentration, and plotted them to ADP concentration.

Although there is a 6nm shift by the absorption max of the fluoro forehead between IDCC-NDPK and IDCC-NDPK-P, in luminescence max, it is only 2nm. Fluorescence quantum yield was measured [coumarin / 314 / in ethanol] about two gestalten of the enzyme which carried out the indicator, using the known value 0.83 [31] as a reference. Although the quantum yield which performed even the enzyme (0.054) of non-phosphorylation from the enzyme (0.22) which carried out phosphorylation was well in agreement in change which decreases 4 times and by which luminescence reinforcement was observed (drawing 2), its quantum yield of phosphoenzyme was still clearly lower than the coumarin 314 (0.52) in a buffer.

[0023]

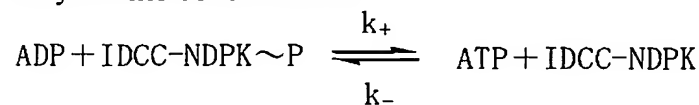
Transitional dynamics Stop flow equipment performed three different transitional dynamics measurement.

In the first place, the dephosphorization rate of IDCC-NDPK-P was measured in the range of ADP concentration. Drawing 6 A shows the luminescence data about mixing of ADP (a) of 50microM which has protein of 1microM in PIPES of 20mM(s), pH 7.0, and MgCl₂ of 2mM, and ADP (b) of 250microM. The observed rate constant (a: $11.1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$; b: $57.2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$) increased to linearity in proportion to the increment in ADP concentration, and the secondary rate constant was calculated from the inclination of a linearity fit, and it obtained $0.21 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (drawing 6 C).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In the second experiment, the phosphoenzyme production rate was measured by mixing an IDCC-NDPK-P enzyme and ATP (drawing 6 B). Again, linear increase of the rate was carried out by the increment in ATP (it is $18.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ in ATP of $50 \mu\text{M}$ at ATP of $5.57 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; $250 \mu\text{M}$), and the secondary rate constant drawn was $0.072 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (drawing 6 C).

In the third experiment, the dephosphorization rate was measured under existence of ATP of various concentration. Although the observed rate was more larger than the bottom of the nonexistence under existence of ATP, a change on the strength was more small. From the inclination of the dashed line (**) of drawing 6 C, a secondary rate constant is calculated with $0.135 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ under existence of ATP. The increment in the rate produced by ATP is expressed as follows by taking the equilibrium of an enzyme into consideration.



The rate observed is $k_+[ADP] + k_-[ATP]$, therefore increases with $[ADP]$ and $[ATP]$.

This rate acceleration is [in / a muscle fiber] advantageous when ATP level is usually 1 mM at least. Even if the dephosphorization of phosphoenzyme is ADP concentration low in early stages, it needs to be dramatically early.

[0024]

Measurement in a single muscle fiber The experiment was psoas fiber of a rabbit single under existence of calcium $^{2+}$, and it went as intrinsically indicated by reference 32 with the following modification. In order to remove Background ADP, the incubation of the fiber for 10 minutes followed the incubation for [it can set in the addition liquid containing IDCC-NDPK-P of $380 \mu\text{M}$, and NPE cage-ized ATP (P3-1-(2-nitrophenyl) ethyl ester of ATP) of 5 mM (s)] 10 minutes on the stiffness solution (rigor solution) containing 8 U/ml apyrase. Fiber was moved to silicone oil and ATP (about 1 mM) was emitted by the laser flash plate photolysis (347 nm) by zero time amount. The temperature in the case of an experiment was 18°C , and water solutions were $\text{pH} 7.1$ and $\text{pCa} 4.5$. Fluorescence excitation is 425 nm and luminescence was detected through the long pass filter (450 to 650 nm).

Fluorescence trace (curve of the bottom of drawing 7) after time amount zero is a phase to which it becomes from three parts and a flash artifact, the delay of the time amount which the first ATPase cycle subsequently produces about ADP, and the fluorescence that expresses the reaction of IDCC-NDPK-P and ADP to the last decrease the 1st gently. The inclination in early stages of this curve gives the ADP bleedoff rate from the actomyosin of 11 s^{-1} .

The same experiment of the muscle fiber using NPE cage-ized ADP for measuring ADP production regardless of myosin ATPase can maintain the susceptibility and reactivity about ADP, when (i) phosphoenzyme is in a muscle fiber, it can detect ADP to which the (ii) signal is emitted from myosin ATPase, and shows that it is the tension under development (developing tension) with the format it is expected that a muscle fiber (iii) is.

[0025]

Nucleotide exchange of the human Rho protein origin The rate of nucleotide exchange of small G-protein and the rho (it also has GTPase activity) origin was measured in the solution. Moreover, the rate of hydrolysis was obtained indirectly.

Human rho protein was prepared with the gestalt including GDP joined closely. Under existence of GTP added superfluously, when measured according to this invention, nucleotide exchange is produced so that GDP may be emitted to an isolation solution (free solution). Once GTP combines with rho, the catalyst of the hydrolysis will be slowly carried out at the rate of a steady state with protein. This produces more GDP, and once it is emitted, it will be measured.

Firefly luminescence was recorded with the solution of $200 \mu\text{l}$ containing the tris of 20 mM (s) / HCl , $\text{pH} 7.6$, MgCl_2 of 1 mM , $2(\text{NH}_4) \text{SO}_4$ of 100 mM , GTP of $10 \mu\text{M}$, and IDCC-NDPK-P of $2 \mu\text{M}$. The reaction was started by $t = 0$ by adding Rho.GDP of $2 \mu\text{M}$. Excitation was 440 nm by the luminescence monochromator set as 475 nm . Temperature was 30°C . Data were standardized

THIS PAGE BLANK (USPTO)

using fluorescence change about GDP of 1microM obtained from titration of IDCC-NDPK-P by different GTP/GDP ratio. Data ([drawing 8](#)) were made to fit the first [+] 41.2nM GDP min-exponential-function [single] function which has the inclination (after division by [Rho], $3.43 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$) of 1 in a rate constant [of 0.196min^{-1}], and linearity term by the exponential phase. An exponential function "a burst" expresses exchange with GDP and GTP which were combined with rho. A linearity term expresses a steady state and exchange of GTP to a rho top is further restricted by the hydrolysis to GDP.

Moreover, the rate was measured also by the 'standard' approach and obtained the same result. The good thing will be understood to be a line, as long as this invention is indicated by only the example above and amelioration is included in the range of this invention, and an intention.

[0026]

Reference (the content shall be included in this description as a whole)

1. Holmsen et al. (1972) Anal. Biochem. 46: 489-501. 2. Kimmich et al. (1975) Anal Biochem 69: 187-206. 3. Loxdale (1976) J Physiol (Lond) 240-4P-5P. 4. Spielmann et al. (1981) Anal Biochem 113: 172-178. 5. Feradui et al. (1981) Int J Sports Med 2: 106- 109. 6. Brovko et al. (1994) Anal Biochem 220 : 410-414. 7. Schultz et al. (1993) Anal Biochem 215 : 302-304. 8. Tornheim & Schultz (1993) Anal Biochem 211: 329-330. 9. Pogson et al. (1979) Int J Biochem 10: 995-1000. 10. de Azeredo et al. (1979) Anal Biochem 95: 512-519. 11. Sato et al. (1983) Anal Biochem 135: 431-435. 12. Goswami & Pande (1984) J Biochem Biophys Methods 9: 143-151. 13. Cerpovicz & Ochs (1991) Anal Biochem 192 : 197-202. 14. Brindle et al. (1990) Biochem 29 : 3295-3302. 15. Petersen et al. (1990) Biochim Biophys Acta 1035: 169-174. 16. Williams et al. (1993) J Mol Biol 234: 1230-1247. 17. Morera et al. (1995) Biochemistry 34: 11062-11070. 18. Schaertl et al. (1998) J Biol Chem 273: 5662-5669. 19. Sundin et al. (1996) J. Bacteriol 178: 7120-7128. 20. Izumiya & Yamamoto (1995) J Biol Chem 270: 27859-27864. 21. Corrie (1994) J Chem Soc and Perkin Trans 1 : 2975-2982. 22. Parks & Agarwal in The Enzymes, 3rd ed. (ed. Boyer) 8 : 307-333. 23. Agarwal et al. (1978) Methods Enzymol 51: 376-386. 24. Jong & Ma (1991) Arch Biochem Biophys 291: 241-246. 25. Sambrook et al. (1989) Molecular cloning-a laboratory manual. 26. Munoz-Dorado et al. (1990) J Biol Chem 265 : 2702-2706. 27. Munoz-Dorado et al. (1990) J Biol Chem 265: 2707-2712. 28. Olsen et al. (1993) Meth Enzymol 217: 189-217. 29. Kindly provided by Dr R Williams. Cambridge. 30. Almaula et al. (1995) J Bacteriol 177: 2524-2529. 31. Fletcher & Bliss (1978) Appl Phys 16: 289-295. 32. helium et al. (1997) J. Physiol. 501.1 : 125-148. [easy explanation of a drawing]

[[Drawing 1](#)]

A desirable fluorescence indicator and the structure of IDCC are shown.

[[Drawing 2](#)]

(A) The emission spectrum of IDCC-NDPK is shown under existence of ADP/ATP and (B) GDP/GTP.

[[Drawing 3](#)]

Titration of the IDCC indicator phosphoenzyme by ADP/GDP (void notation O and **) and ATP/GTP (black painting notation - and **) is shown.

[[Drawing 4](#)]

The same experiment using non-phosphoenzyme is shown.

[[Drawing 5](#)]

The calibration curve from which fluorescence change is obtained in the stop flow experiment which shows how it changes to ADP concentration is shown.

[[Drawing 6](#)]

The transitional dynamical data obtained using stop flow fluorescence are shown. A broken line expresses the best fit of a single exponential function. 6A and 6B show the data obtained by ADP and ATP. 6C shows the plot of the rate constant obtained to ADP (O) or the ATP(-) concentration. A continuous line shows the best fit of a linear equation which has the drawn secondary rate constant. A broken line and a rectangular head (**) show the observed rate constant which was obtained when ADP titration was repeated under existence of ATP of 1mM.

[[Drawing 7](#)]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The plot obtained from the single rabbit psoas muscle fiber (single rabbit psoas muscle fibre) (the membrane exclusion was carried out) which shows a subordinate reduction of the fluorescence for the increment in muscular tension and the dephosphorization of IDCC-NDPK-P is shown.

[Drawing 8]

The plot obtained using the human low protein (rho protein) in which bleedoff of GDP to the inside of a solution is shown is shown. Data made like first [+] single exponential-function fit an equation, as shown by the continuous line.

[Translation done.]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

* NOTICES *

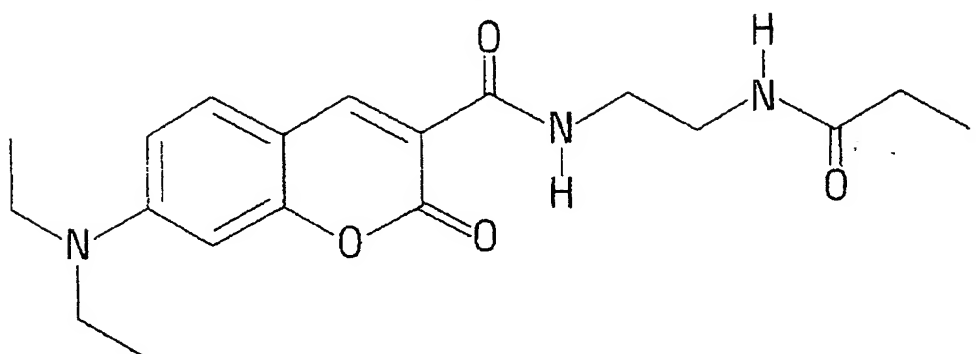
JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

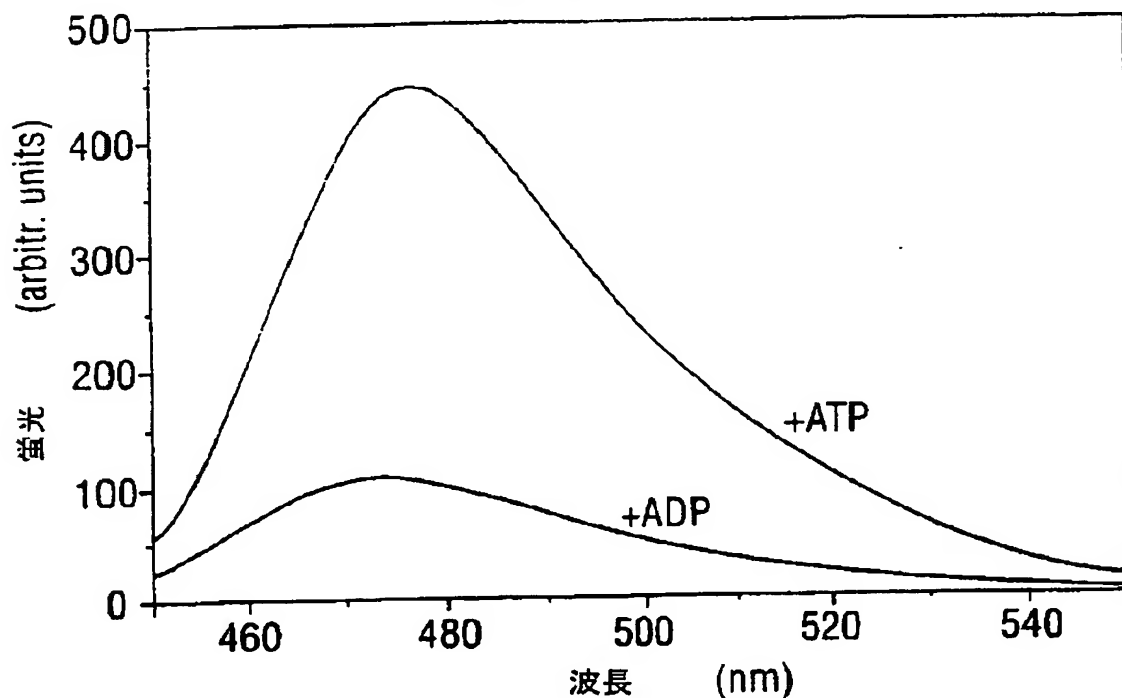
[Drawing 1]

Fig. 1



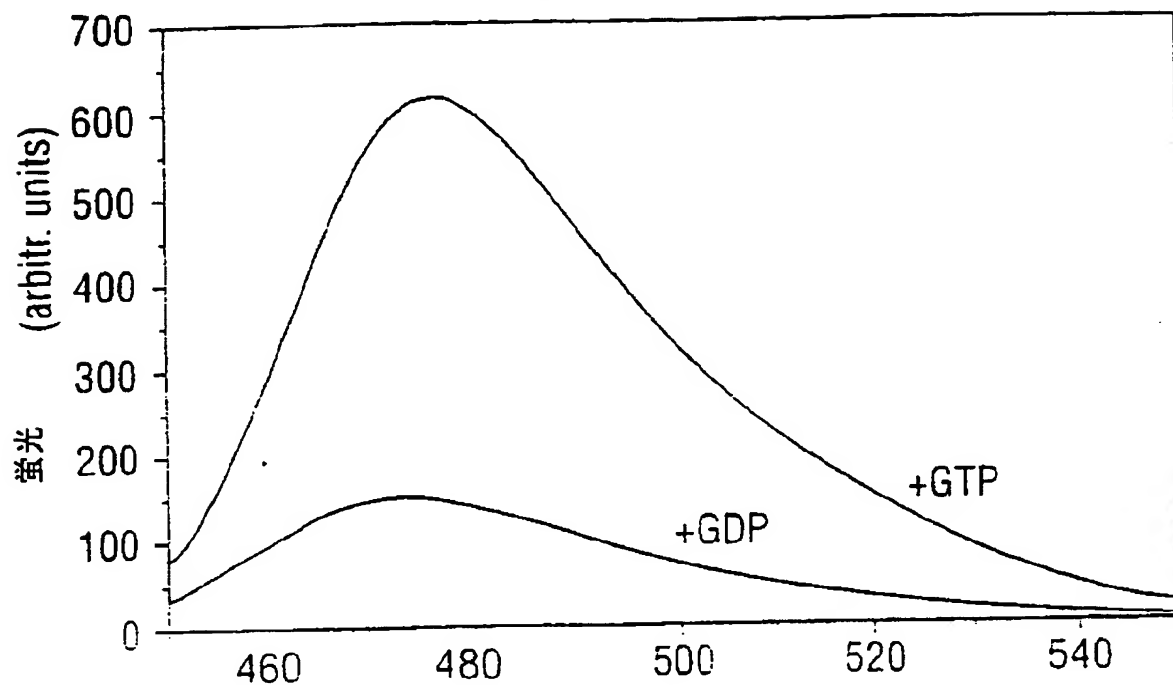
[Drawing 2 A]

Fig. 2A

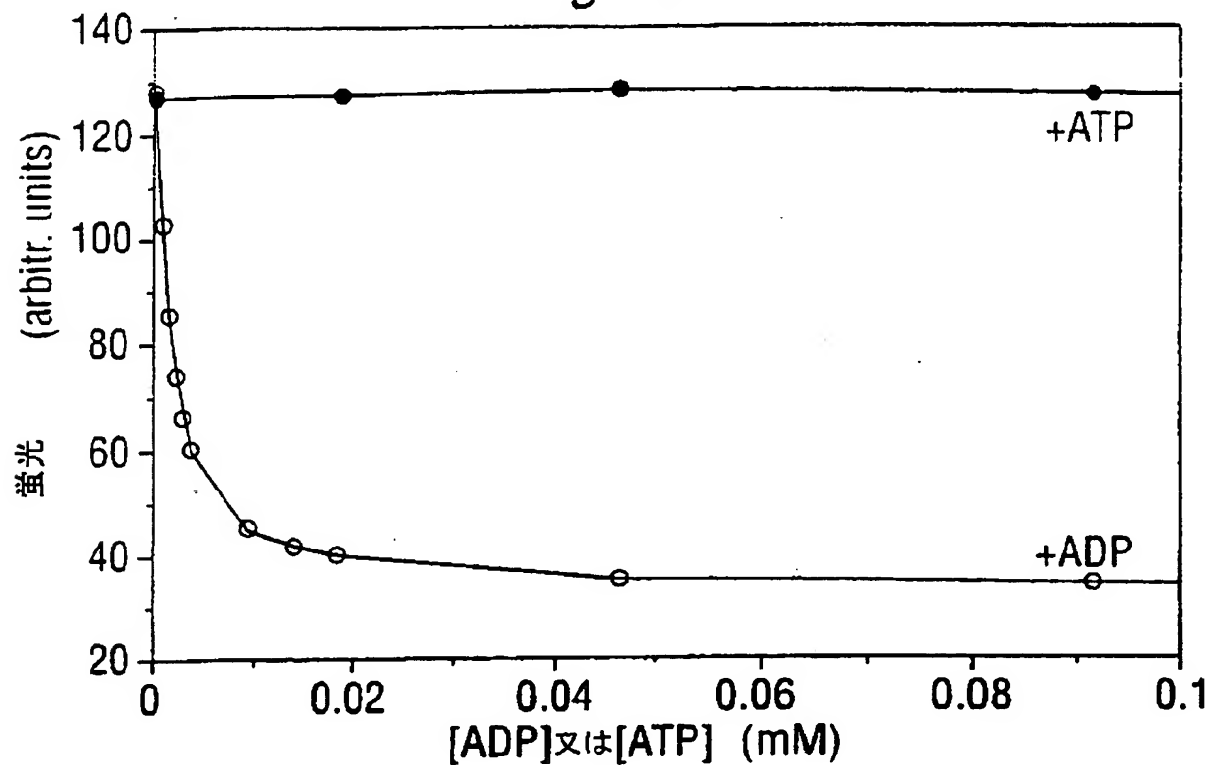


THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Drawing 2 B]

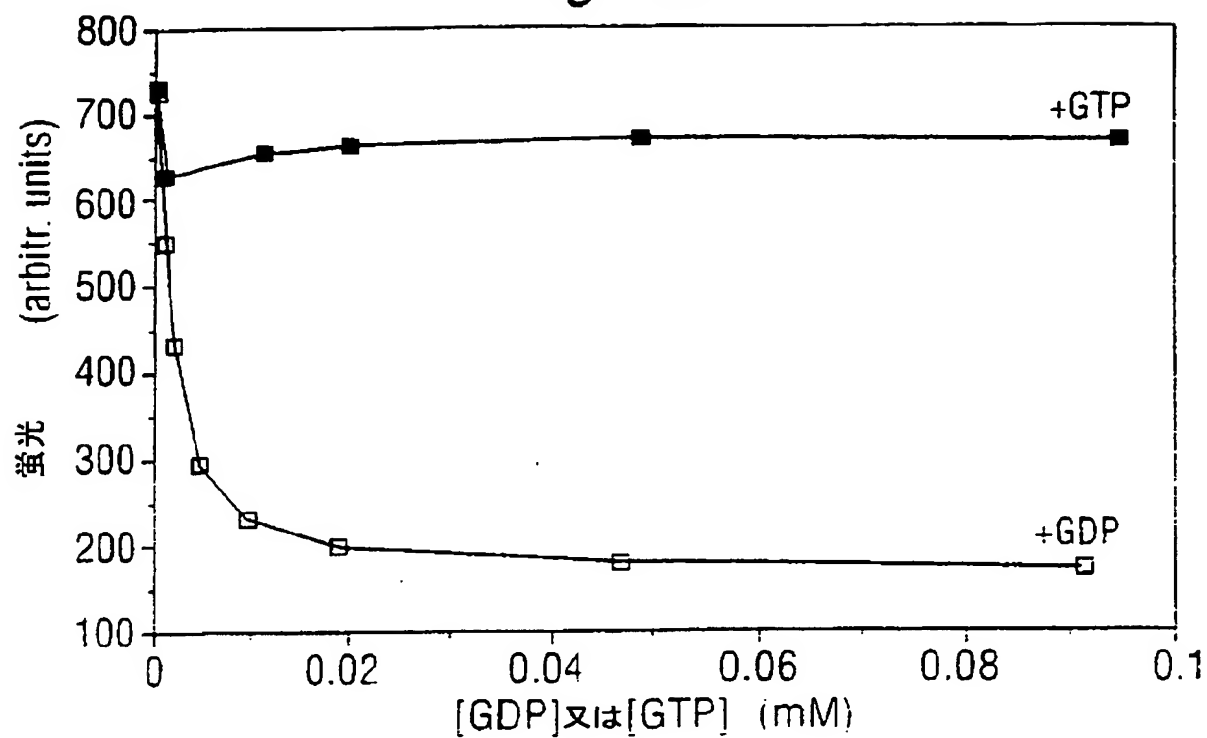
Fig. 2B

[Drawing 3 A]

Fig. 3A

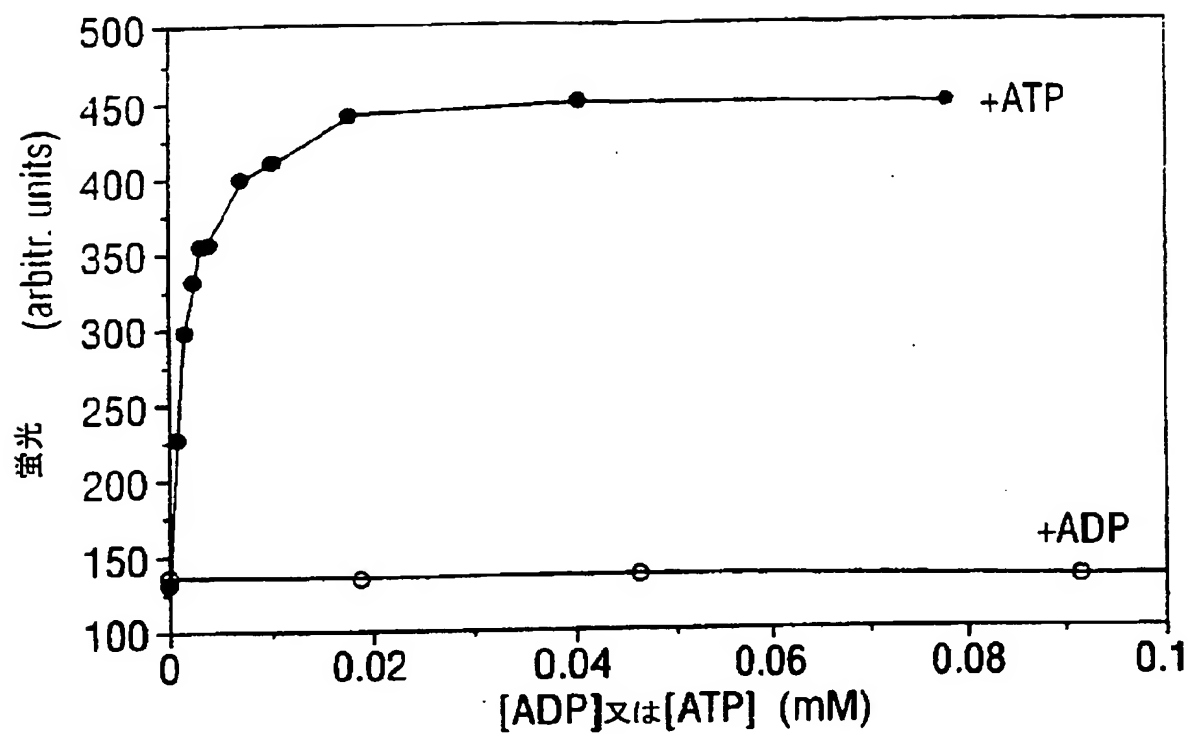
THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Drawing 3 B]

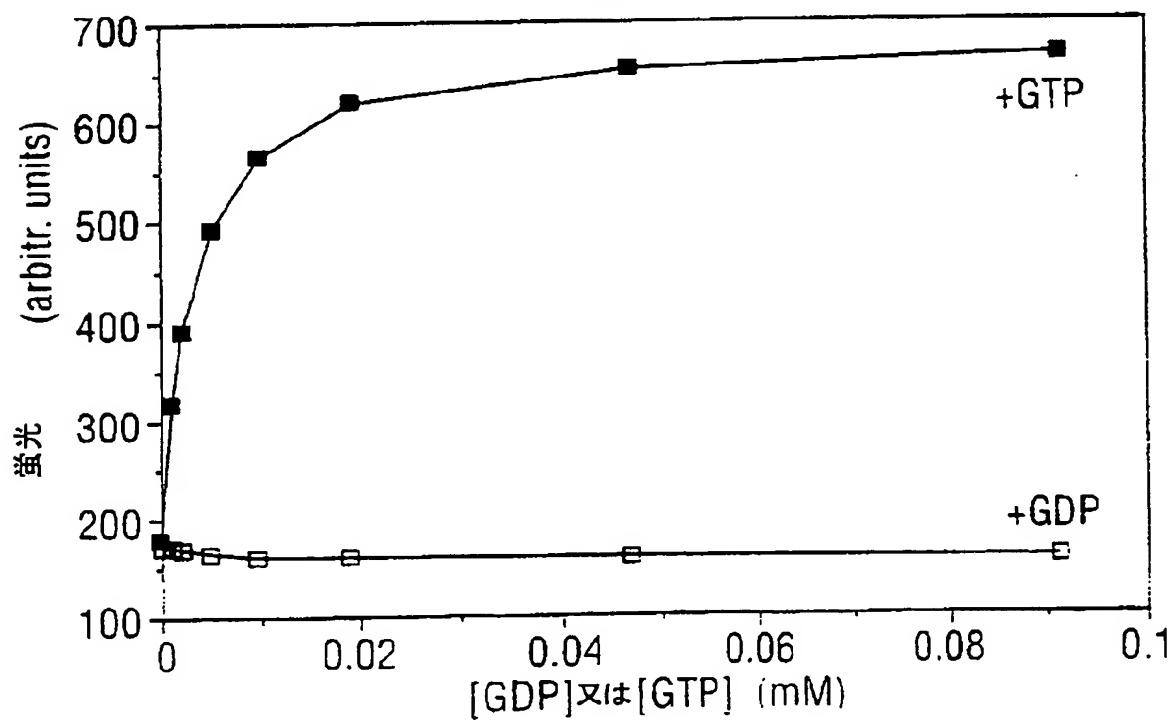
Fig. 3B

[Drawing 4 A]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 4A

[Drawing 4 B]

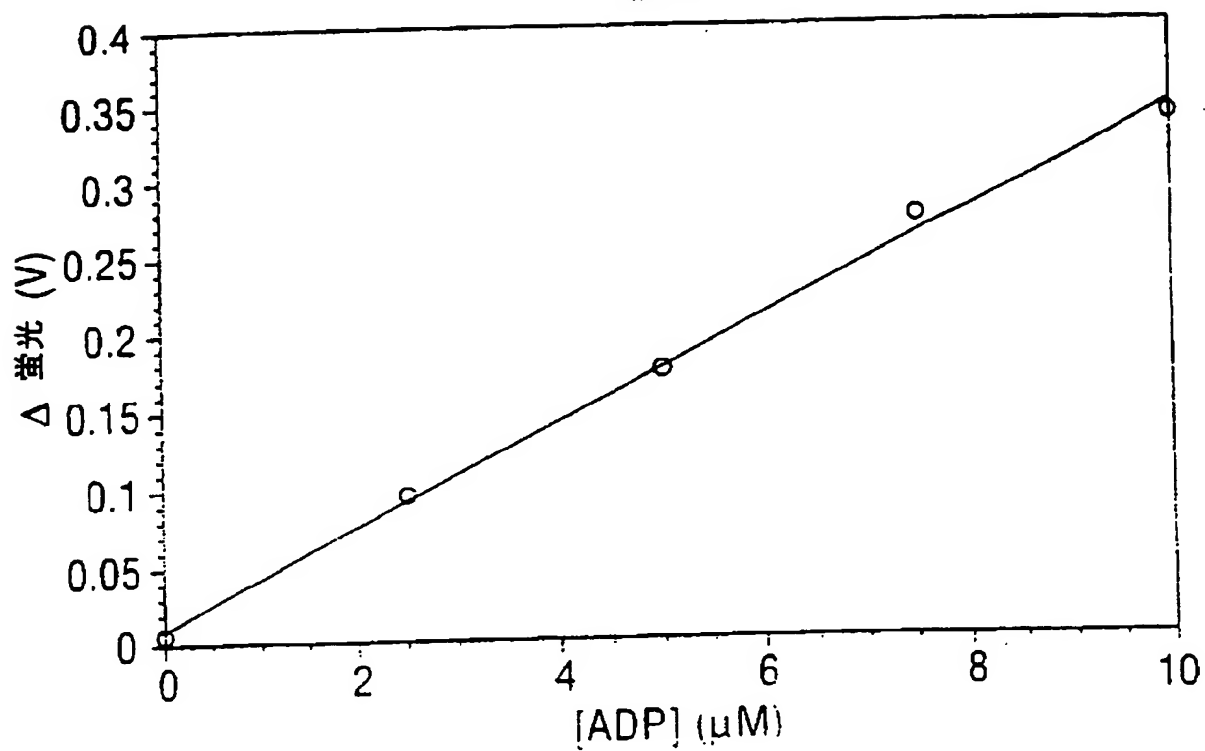
Fig. 4B

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Drawing 5]

Fig. 5

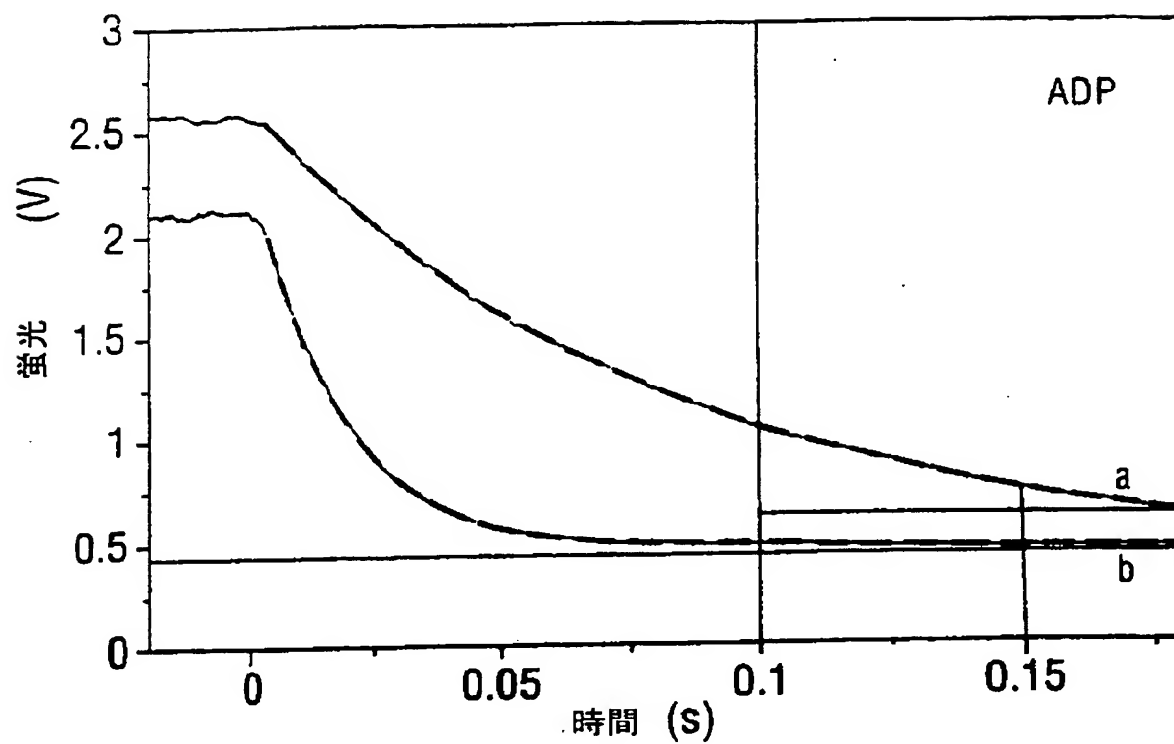
校正



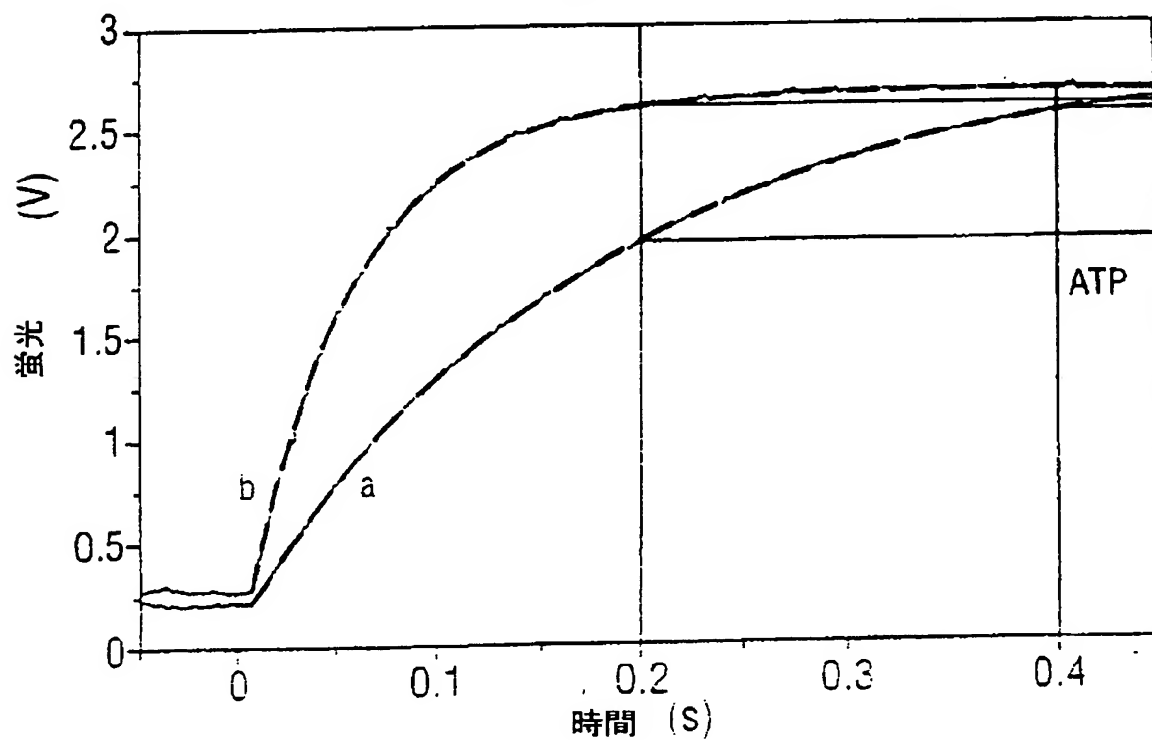
[Drawing 6 A]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

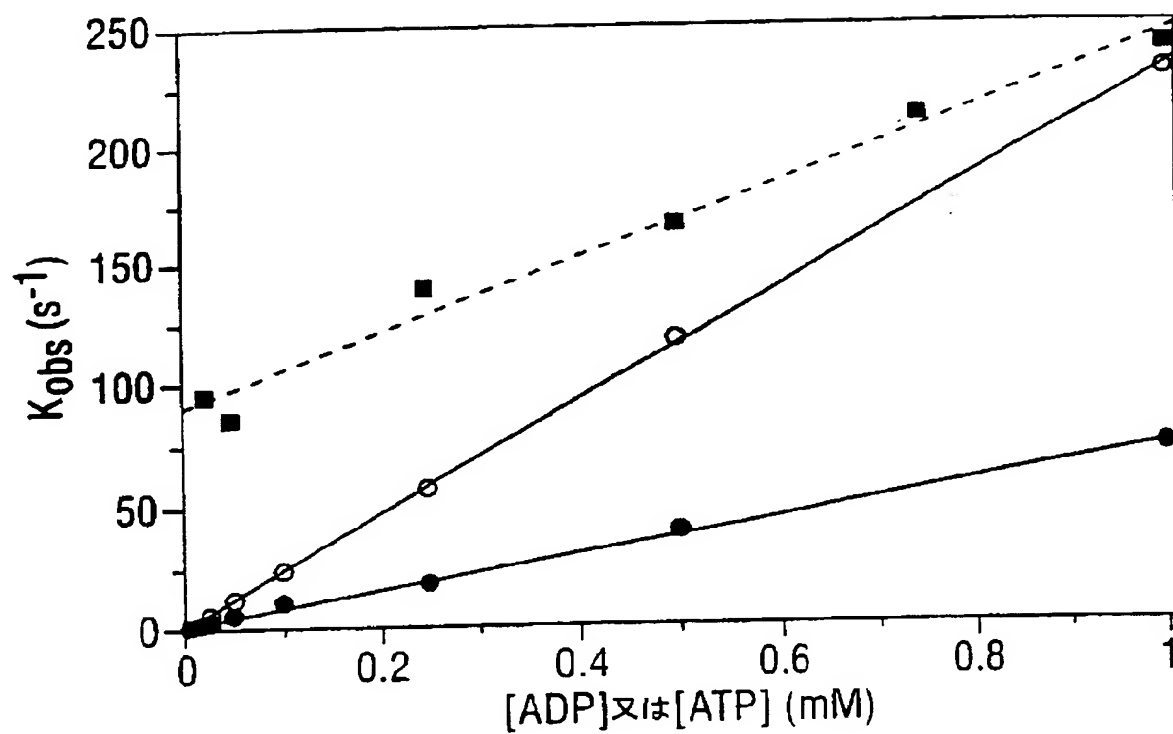
Fig. 6A

[Drawing 6 B]

Fig. 6B

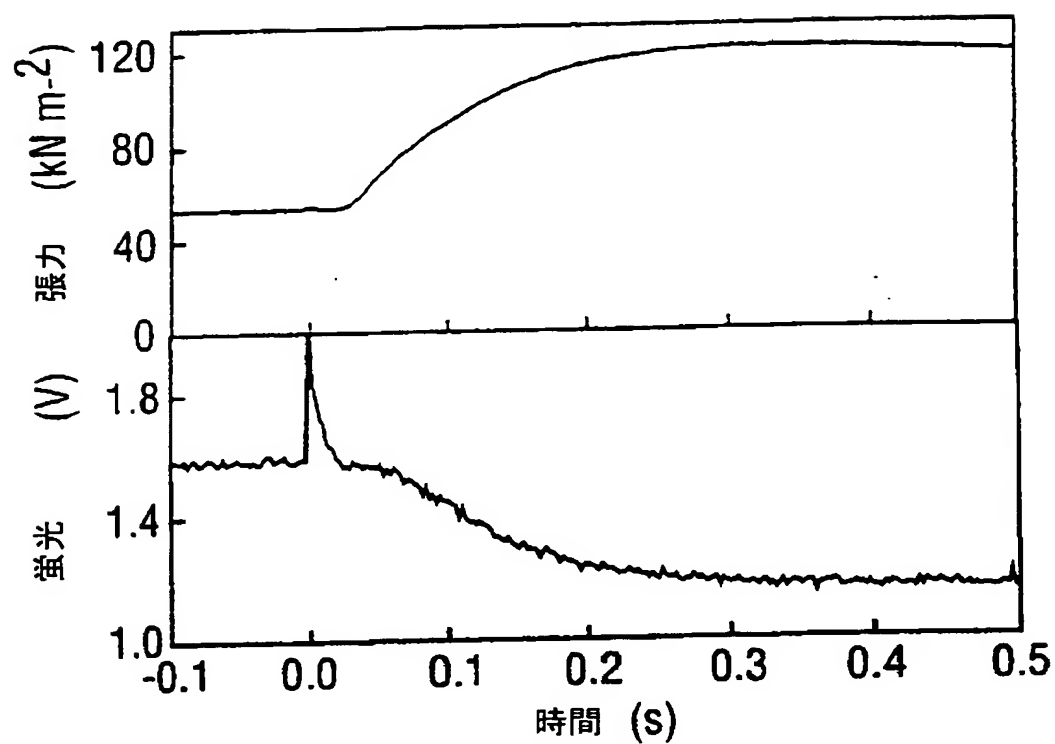
THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Drawing 6 C]

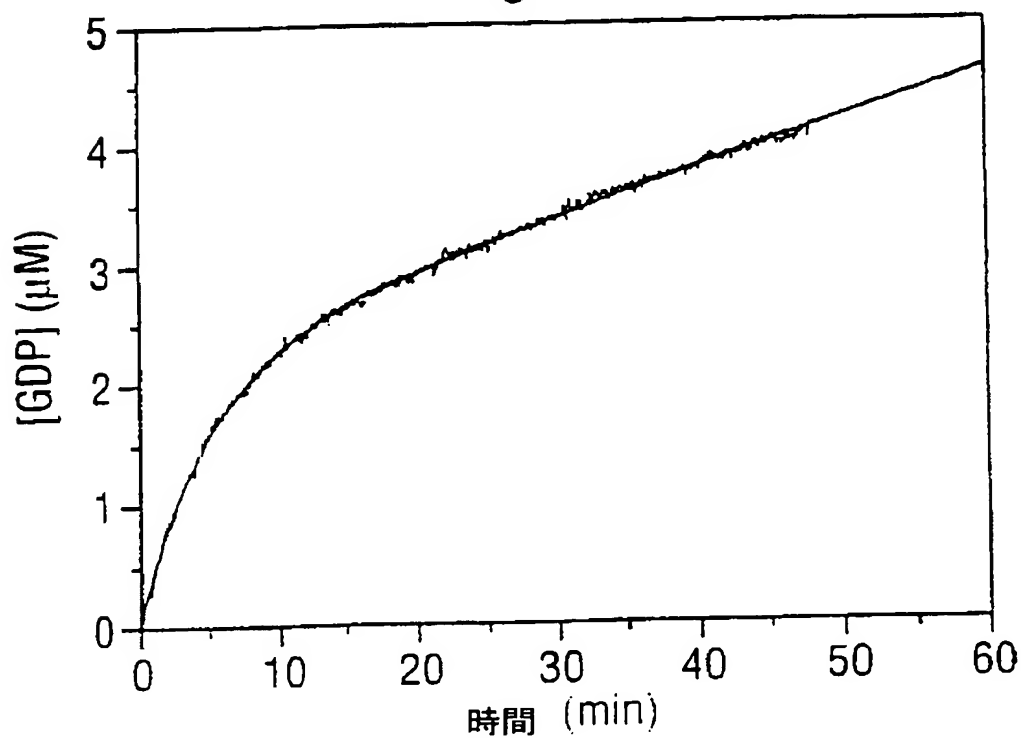
Fig. 6C

[Drawing 7]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 7

[Drawing 8]

Fig. 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Translation done.]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)